



TITLE:

in vitro系を用いたmRNAスプライ
シング反応機構の研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

澤, 斉

CITATION:

澤, 斉. in vitro系を用いたmRNAスプライシング反応機構の研究. 京都大学, 1991, 理学博士

ISSUE DATE:

1991-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/2964284>

RIGHT:

本文は出版社の公開条件により公開していない部分があります

②

主論文 1

*in vitro*系を用いた
mRNAスプライシング反応機構の研究

澤 齊

目次

| | |
|--|----|
| 要旨 | 3 |
| 第一章 序論 | 5 |
| 第二章 材料と方法 | 16 |
| 第三章 結果 | |
| 第一部 スプライシング反応の第二段階の解析 | |
| a) 第二段階の反応のATP要求性 | 21 |
| b) 第二段階の反応に必要なスプライシング因子 | 26 |
| c) mRNA前駆体の固定化 | 28 |
| d) 第二段階の反応の二つの過程への分解 | 28 |
| e) スプライスソームIIb形成に必要な因子 | 32 |
| f) 3' スプライス部位領域のRNaseHに対する感受性の変化 | 34 |
| g) 通常の核抽出液を用いたスプライシング反応での 3' スプライス部位領域のRNaseHに対する感受性の変化 | 36 |
| h) スプライシング産物解離因子 | 38 |
| 第二部 U6snRNAとmRNA前駆体とのアソシエーション | |
| a) 研究の背景 | 41 |
| b) snRNAのmRNA前駆体とのアソシエーション | 41 |
| c) スプライスソーム内でのU6snRNAのmRNA前駆体との アソシエーション | 45 |
| d) クロスリンク部位の解析 | 47 |
| 第四章 考察 | |
| a) 固定化したmRNA前駆体を用いた実験系 | 53 |
| b) 第二段階の反応に関与する因子 | 53 |
| c) スプライシング反応経路と3種類のスプライスソーム | 54 |
| d) スプライスソームのコンフォメーションの変化 | 55 |
| e) 第二段階の反応に必要なATPの役割 | 58 |
| f) SRFの役割 | 58 |

| | |
|--|----------|
| g) U1snRNAとU2snRNAのmRNA前駆体との アソシエーション | ----- 59 |
| h) U6snRNAとmRNA前駆体とのアソシエーション | ----- 60 |
| i) U6snRNAはスプライシング反応を触媒するか? | ----- 60 |
| j) スプライシング反応過程のモデル | ----- 61 |
| 謝辞 | ----- 65 |
| 引用文献 | ----- 66 |

要旨

mRNAスプライシング反応では、まず、5種類のsnRNP等の数多くの因子がmRNA前駆体上に集合し、巨大な反応複合体、スプライスソームが形成される。その後、このスプライスソーム内で、イントロンは、5' スプライス部位が切断されラリアット構造が形成される第一段階と、3' スプライス部位が切断されエキソンが連結される第二段階の、2回の反応を受けて除去される。イントロンが除去される機構を解明するため、本研究においてはまず、第二段階の反応に焦点を絞り、この反応を詳細に解析した。

HeLa細胞の核抽出液をあらかじめ熱処理してから、*in vitro*スプライシング反応に用いると、第一段階の反応のみが起こる。そして、その後、熱処理していない核抽出液等を加えると第二段階の反応が効率よく起こり、この反応だけを特異的に解析できる。この実験系で、第二段階の反応を解析し、第二段階の反応にATPと少なくとも2種類のタンパク因子が必要なことを明らかにした。また、mRNA前駆体をアガロースビーズ上に固定化する実験系を開発し、これらの因子のスプライスソームへの作用機序等を解析した。そして、第二段階の反応が次のような2つの過程に分けられることが明らかになった。まず、熱処理した核抽出液によって形成されたスプライスソーム（スプライスソームIIa）に2種類のタンパク因子が作用し、スプライスソームIIbが形成される。そして、第二段階の反応は、スプライスソームIIbから、ATPのみを要求して起きる。また、これらのスプライスソームの3' スプライス部位領域に、スプライスソームの構成因子が結合しているかどうかを、この領域に相補的な合成DNAの存在下でのRNaseHに対する感受性を指標にして解析した。その結果、第一段階の反応前のスプライスソームでは、3' スプライス部位領域には、スプライスソームの構成因子が結合しているが、第一段階の反応後のスプライスソームIIaでは因子が結合しておらずRNaseHに対して感受性であることが明らかになった。さらに、スプライスソームIIbでは、3' スプライス部位領域には、何らかの因子が結合し、RNaseHに対して再び耐性になることがわかり、スプライシング反応過程で、スプライスソームのコンフォメーションが変化していることが明らかになった。

次に、スプライシング反応過程で起こるmRNA前駆体とsnRNAとの直接の相互作用を、UVクロスリンク法を用いて解析した。その結果、過去に

mRNA前駆体と相互作用することが報告されているU1snRNAとU2snRNAに加えて、U6snRNAが5' スプライス部位領域に直接アソシートしていることが観察された。最近、いくつかの間接的な理由から、U6snRNAがスプライシング反応を触媒するという仮説が提唱されているが、スプライシング反応過程でRNA鎖の切断再結合反応が起こる部位の一つである5' スプライス部位にU6snRNAが近接して存在しているという筆者の発見は、この仮説を強く支持している。

第一章 序論

真核生物の多くの遺伝子は、介在配列（イントロン）によって分断されていることが知られている。これらの遺伝子から転写された前駆体RNAは、イントロンが除去されて初めて機能的なRNAになる。この反応は、スプライシング反応と呼ばれ、遺伝子が発現する上で必須な過程の一つである。

スプライシング反応は、遺伝子の種類によっていくつかに分類できるが、その反応機構は主に *in vitro* 系を用いて研究されてきた。rRNA前駆体のスプライシング反応は、生物種によって様式が若干異なるが、エンドヌクレアーゼとリガーゼによって触媒されることが明らかにされている（KrainerとManiatisの総説、1988）。テトラヒメナのrRNA前駆体のイントロンは、タンパク因子の関与なしに、イントロン自身の酵素活性によって除去されることが知られている（セルフスプライシング、Cechの総説 1990）。このイントロンに見られる配列や二次構造を持ったイントロンが、種々の生物のミトコンドリアや葉緑体の遺伝子中にも見いだされている。これらは総称してグループIイントロンと呼ばれ、そのうちいくつかはテトラヒメナのrRNA前駆体イントロンと同様にセルフスプライシング反応をすることが知られている（Cechの総説 1990）。グループIイントロンのセルフスプライシング反応では、まず補助因子であるグアノシンが5' スプライス部位を攻撃、切断し、同時にグアノシンはイントロンの5' 末端に連結される。次に5' エキソンRNAの3' -OH基が3' スプライス部位を攻撃し、3' スプライス部位が切断され、同時に二つのエキソンが連結される（図1）。この二段階の反応は、いずれもホスホジエステル結合の切断と再形成が共役して起こるエステル交換反応である。

グループIとは異なった保存配列や二次構造を持つイントロンがミトコンドリアや葉緑体の遺伝子中に知られており、グループIIイントロンと呼ばれている（CechとBassの総説 1986）。グループIIイントロンのいくつかはセルフスプライシング反応をすることが知られているが、その反応様式はグループIの場合とは異なり、核遺伝子由来のmRNA前駆体のスプライシング反応（mRNAスプライシング反応）の場合と同じである（図1、KrainerとManiatisの総説 1988）。これらのイントロンのスプライシング反応は、次のような2回のエステル交換反応によって起こる。第一段階では、前駆体RNAの5' スプライス部位が切断され、同時にイントロンの5' 末端が

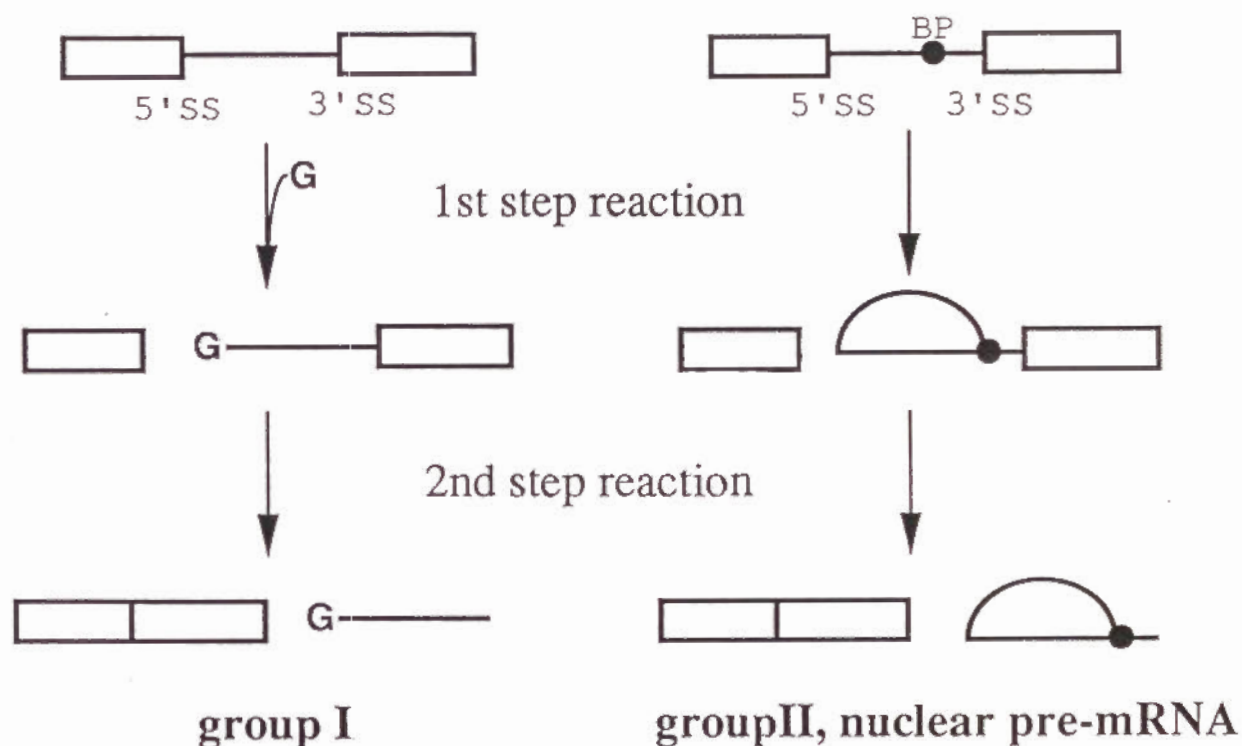


図1. スプライシング反応経路

グループI、グループIIイントロンのセルフスプライシング反応、及び mRNA スプライシング反応経路を模式的に表した。図中、Gはグアノシンを、5'SSは5'スプライス部位を、3'SSは3'スプライス部位を、BPはブランチ部位を表す。グループIIイントロンのスプライシング反応と mRNA スプライシング反応とは反応経路は同じだが、mRNA スプライシング反応には、数多くの因子が必要である。

3' スプライス部位の少し上流のブランチ部位に、2' - 5' のホスホジエステル結合で連結される。この結果、5' エキソンRNAとラリアット構造をしたRNA（ラリアット型中間体）が反応中間体として産生される。第二段階では、3' スプライス部位が切断され、同時に二つのエキソンが連結され、mRNAとラリアット構造を持つイントロン（ラリアット型イントロン）が産生される。このようにグループIIイントロンのスプライシング反応とmRNAスプライシング反応は、反応様式は同じであるが、グループIIの反応がセルフスプライシングによって起こることがいくつかの例で示されているのに対し、mRNAスプライシング反応にはmRNA前駆体以外に数多くの因子が必要であり、反応を触媒する因子など、その反応機構はまだ明らかにされていない点が多い。

mRNAスプライシングの反応機構は、主にHeLa細胞の核抽出液と、*in vitro*で合成したmRNA前駆体を用いた、*in vitro*スプライシング系によって研究されてきた。その結果、前述の二段階の反応様式に加えて、ATPおよび Mg^{2+} イオンが必要であること、反応を始めてから中間体が産生されるまでに15-30分の遅滞時間があることなどが最初に明らかにされた。また、スプライシング反応には、snRNA(small nuclear RNA)といくつかのタンパク質の複合体であるsnRNP(small nuclear ribonucleoprotein particle)など多くの因子（スプライシング因子）が関与していることも明らかにされた（Padgettら 1983、HernandezとKeller 1983、Kraimerら 1984、Hardyら 1984）。

現在までに、U1、U2、U4、U5、U6の5種類のsnRNPがスプライシング反応に関与していることが明らかにされている（GuthrieとPattersonの総説 1988）。このうちU4とU6snRNPはsnRNA間の塩基対合を介してヘテロダイマーを形成している（U4/U6snRNP）。これらのsnRNPに共通のタンパク質に対する抗体（Sm抗体）を加えるとスプライシング反応は阻害される。また、マイクロコッカスのヌクレアーゼ（MNase）で前処理してsnRNAを分解した核抽出液を用いるとスプライシング反応は起こらない。5種類のsnRNPのうちU1snRNPはそのRNA成分の5' 末端の配列がスプライス部位の配列と相補的であることから、スプライシング反応に関与している可能性が早くから指摘されていた（Lernerら 1980）。その後、U1snRNPに特異的な抗体を反応系に加えたり（Padgettら 1983）、U1snRNAに相補的な合成DNAとRNaseHを用いて核抽出液中のU1snRNAを壊す（Kraimerら 1984）

とスプライシング反応が阻害されることから、このsnRNPが反応に必要なことが証明された。また、5' スプライス部位の保存配列の塩基置換変異によりスプライシング反応を受けなくなったmRNA前駆体は、U1snRNAの5' 末端の配列を、変異した5' スプライス部位と相補的に換えることにより反応性が回復することなどから、U1snRNPが、U1snRNAと5' スプライス部位との塩基対合を介して、この部位に結合することが示されている (ZhuangとWeiner 1986)。U2、U4、U6snRNPについても、各snRNAに相補的な合成DNAとRNaseHを用いた実験より、スプライシング反応に必要なことが明らかにされている (KrainerとManiatis 1985、Blackら 1985、BergetとRobberson 1986、BlackとSteitz 1986)。このうちU2snRNPは、U1snRNPの場合と同様に塩基置換変異を用いた実験から、mRNA前駆体のブランチ部位に塩基対合を作って結合する事が示されている (ZhuangとWeiner 1989)。しかし、U1snRNPの結合は単独で、ATPに依存せず、水中でも起こるが (Blackら 1985、BindereifとGreen 1987)、U2snRNPの結合にはATPと補助因子、U2AF (U2 auxiliary factor)、が少なくとも必要である (Ruskinら 1988)。U5snRNPに関しては、そのRNA成分が、リボヌクレアーゼに対して耐性なので、スプライシング反応に必要なことを直接証明することは困難であった。しかし、マイクロコッカスのヌクレアーゼに耐性のsnRNPのタンパク質が3' スプライス部位に結合することや (Chabotら 1985)、U5snRNAがスプライスソーム中に存在していること (GrabowskiとSharp 1986)、核抽出液を分画して反応系を再構成した場合、U5snRNPを含む分画が反応に必要なこと (Winkelmannら 1989) などから、U5snRNPがスプライシング反応に関与していると考えられる。

スプライシング反応にはsnRNP以外にも多くのタンパク因子が関与している。KrainerとManiatisは (1985)、snRNP以外に、細胞質S100フラクションには存在せず核抽出液のみに活性の見られるタンパク因子 (SF2) と、熱に弱いタンパク因子 (SF3、HLF) がスプライシング反応に必要なことを示した。このうちHLFは第二段階の反応にのみ必要である。SF2は最近精製され、反応の初期に関わっていること、5' スプライス部位の選択に影響を与えることなどが示された (Krainerら 1990a、Krainerら 1990b)。また彼らは、カラムクロマトグラフィーを用いて、上記の因子以外に第一段階の反応に必要な因子 (SF4A) と第二段階の反応にのみ必要な因子 (SF4B) を同定している (KrainerとManiatis 1985)。カラムクロマトグラフィ

ーを用いて核抽出液を分画し、スプライシング因子を同定する試みは他のグループでも行われている。HurwitzらのグループではDEAE-celluloseカラムとBio-Rex70カラムを用いて核抽出液を三つの分画 (Ia、Ib、II) に分けた (Perkinsら 1986)。このうち、Ia中に存在する因子は、第二段階の反応にのみ必要である。またKellerらのグループでは、高速液体クロマトグラフィーを用いて核抽出液から4種類のタンパク因子 (SF1-4) を分画した (Kramerら 1987)。このうちSF1とSF3は、後述のプレスプライスソーム形成に必要であることが示されている (Kramer 1988)。

また、抗体を用いたスプライシング因子の解析も行われている。*in vivo*で観察される核内不均一RNA (heterogeneous nuclear RNA, hnRNA)は、コアタンパク質と呼ばれる数種類のタンパク質 (A1、A2、B1、B2、C1、C2) などと複合体 (hnRNP) を形成しているが (Dreyfussの総説 1986)、コアタンパク質のうちCタンパク質に対する抗体が、*in vitro*でのスプライシング反応を阻害することから、このタンパク質がスプライシング因子であることが示唆された (Choiら 1986)。FuとManiatisは (1990)、スプライシング反応の際に形成される後述の複合体、プレスプライスソームを分画し、マウスに免疫して、作成されたモノクローナル抗体を用いて、分子量35キロダルトンのスプライシング因子 (SC-35) を同定した。

mRNA前駆体に直接結合する因子を検索する試みも行われている。スプライシング反応に必要なmRNA前駆体の保存された配列は、5' スプライス部位領域 ((C/A)AG:GU(A/G)AGU)、ブランチ部位領域 (PyPyPuAPy)、3' スプライス部位領域 ((Py)_nN(C/U)AG:G) の三つの領域であるが (はスプライス部位を表す、Greenの総説 1986)、先にも述べたように、5' スプライス部位領域にはU1snRNPが、ブランチ部位領域にはU2snRNPが結合する。3' スプライス部位領域に結合する因子についてはいくつかの報告がある。GerkeとSteitzは (1986)、マイクロコッカスのヌクレアーゼに耐性の因子がこの領域に結合していることをSm抗体を用いた免疫沈降法によって観察し、U5snRNPのタンパク成分の一つが3' スプライス部位領域に結合することを示唆した。Taziらは (1986)、同様の活性をサウスウェスタン法によって検出し、intron binding protein (IBP) と名付けた。SwansonとDreyfussは (1988)、hnRNPのタンパク質のうちA1、C、Dがこの領域に結合することを示した。Garcia-Blancoらは (1989)、この領域のポリピリミジントラクトに特異的に結合する62キロダルトンの因子 (

p62) をUVクロスリンク法によって同定し、精製した。また、前述のU2AFもこの領域に結合する (Ruskinら 1988)。U2AFは最近精製され、ヘテロダイマーであること、スプライシング反応に必須であることが証明された (ZamoreとGreen 1990)。これらの3' スプライス部位領域に結合する因子は、U2AFとCタンパク質を除いて、反応に必須であることは証明されていない。また、これらのうちどの因子がスプライシング反応過程での3' スプライス部位の認識に関与するのかもはっきりしていない。

以上、HeLa細胞の核抽出液中に存在するスプライシング因子について列挙したが、これらの因子の相互の関係についてはわかっていない。また、次に述べる出芽酵母のスプライシング因子と比べても、まだまだ多くの因子が同定されていないようである。

HeLa細胞の系でのスプライシング因子の研究は、上記のように、因子の生化学的性質を用いて解析しなければならないが、出芽酵母の系では、スプライシング反応が起こらなくなった温度感受性突然変異株を用いて遺伝学的に解析することができる。また、多くの場合、温度感受性突然変異株から調製した抽出液を熱処理すると、*in vitro*でスプライシング反応が起こらなくなることがわかり (Lustigら 1986)、生化学的方法を遺伝学的方法と組み合わせて解析することができる。今までに22種類の異なる相補群 (*prp2-11,16-27*) が分離されている (Hartwell 1967、Vijayraghavan 1989)。これらの変異株の非許容温度下での*in vivo*の表現系は大きく3つに分けられる。第一に、mRNA前駆体が全くスプライシング反応を受けずに蓄積する、つまり、第一段階の反応に関わる因子の遺伝子変異であり、多くの相補群がこれに含まれる。そのうちほとんどは後で述べる反応複合体、スプライスソームの形成に関与している。第二は、反応中間体が蓄積する変異 (*PRP16-18*) で、第二段階の反応に関わる因子の遺伝子変異だと考えられる。このうち*PRP16*はmRNA前駆体のブランチ部位の変異を抑制する変異としてとられたが (Coutoら 1987)、最近、第二段階の反応に必要であることが明らかにされている (SchwerとGuthrie 1990)。第三は、切り出されたイントロンが蓄積する変異であり、スプライシング反応後のイントロンの分解に関わる因子の遺伝子変異だと考えられる。これらの遺伝子の多くはクローン化され、対応する遺伝子産物がヒトで同定されている例もある (PintoとSteitz 1989、Garcia-Blancoら 1990)。今後、これらの遺伝子産物に対する抗体などを使った実験によって、個々のスプライシ

ング因子の具体的な働きが明らかにされることが期待されている。

mRNAスプライシング反応において、上記の因子のうち5種類のsnRNPを含むその多くは、スプライスソームと呼ばれる巨大な複合体を形成する過程に関与している。イントロンは、スプライスソームが形成された後、その中で、第一、第二段階の反応を受けて除去される。スプライスソームは、初め、酵母の抽出液を用いたスプライシング反応系で、反応液をグリセロールの密度勾配遠心法によって分画した際に40Sの複合体として観察された (BrodyとAbelson 1985)。HeLa細胞の系でも同様に50-65Sのスプライスソームが観察されている (Grabowskiら 1985、FrederickとKeller 1985)。研究グループにおける沈降係数の差異は、主に実験の条件によるもので本質的な違いではないと考えられる。スプライスソームはスプライシング反応が起こる条件下でのみ形成され、どちらかのスプライス部位を欠くmRNA前駆体を用いた場合や、ATPを加えないと形成されない。この複合体中には、mRNA前駆体の他に反応中間体である5' エキソンRNAとラリアット型中間体が多く観察され、スプライシング反応の場であると考えられた。スプライシング反応ではmRNA前駆体を核抽出液とインキュベートし始めてから反応中間体が観察されるまで、遅滞時間が必要であるが、これはスプライスソーム形成に必要な時間だと考えられる。ところが、スプライスソームをグリセロールの密度勾配遠心法によって分画し、この複合体からスプライシング反応を行わせると、この遅滞時間が短くなる (Grabowskiら 1985)。このことは、スプライスソームがスプライシング反応の場であることを裏付けている。スプライスソームが形成される過程は、主にSharpのグループで複合体を直接ポリアクリルアミドゲルで電気泳動する方法で解析されてきた (KonarskaとSharp 1986、KonarskaとSharp 1987、Lamondら 1987、Lamondら 1988)。それによると、mRNA前駆体はまず、ATP存在下でU2snRNPとスプライスソームの前駆体 (プレスプライスソーム) を形成する。次にU4、U5、U6snRNPがATPに依存してmRNA前駆体とは無関係に一つの複合体 (U4/U5/U6snRNP) を形成し、これがプレスプライスソームに結合してスプライスソームが形成される。その後、第一段階の反応の前にU4snRNPがスプライスソームから解離する。なお、この電気泳動を用いた方法では、U1snRNPを含んだ複合体は観察されていない。また、スプライスソームを密度勾配遠心法とアフィニティクロマトグラフィーによって分画した場合でもU1snRNPは観察されず、U2、U4、U5、

U6snRNPがスプライスソームに含まれていることが観察された (GrabowskiとSharp 1986)。このためSharpらは、U1snRNPは、反応初期に5' スプライス部位の認識に関わった後、複合体から解離すると考えた。しかし、BindereifとGreenは (1987)、アフィニティクロマトグラフィーでスプライスソームを回収してもU1snRNPが存在していることを示した。また、Reedらも (1988)、ゲル濾過クロマトグラフィーで分画したスプライスソームにU1snRNPが存在していることを示した。さらに、最近、電気泳動を用いても、U1snRNPがスプライスソームに存在していることが観察できる方法が開発され (Zillmannら 1988)、U1snRNPはスプライスソーム中にあるが、その結合が弱く、電気泳動などで解離してしまうと考えられるようになった。U4snRNPについても、最終産物であるラリアット型イントロンに結合していることが示唆された (Blencoweら 1989) ことなどからスプライスソームから解離するのではないとする説もある。しかし、U4、U6snRNA間の塩基対合が壊れて、U4snRNPのスプライスソームへの結合が弱くなることは確かだと考えられている。

このようにスプライスソームが形成される過程や、ここでは詳しく触れないが、スプライス部位が認識される機構など、スプライシング反応の初期の過程に関しては様々な研究が行われ、徐々に明らかにされつつある。しかし、スプライスソームが形成された後、スプライスソーム内でイントロンが除去される後期の過程に関して研究された例は少なく、ほとんど解明されていない。その理由は、スプライスソーム形成過程が複雑で、時間がかかるため、その後の反応が不均一に起こり、後期の反応だけを特異的に解析することが困難なためである。このため、スプライシング反応の後期の過程を研究するためには、反応をある特異的な過程で停止させ、その後の反応をできるだけ同調的に行わせて解析することが必要になる。酵母の系では温度感受性突然変異株から調製された抽出液を用いることが有用な手段である。PRP2変異株から調製された抽出液を熱処理して用いると、スプライスソームは形成されるが第一段階の反応は起こらない。この時形成されるスプライスソームをグリセロールの密度勾配遠心法によって分画して、ATPと抽出液を加えるとその後のスプライシング反応を追跡することができる (Linら 1987)。この反応を解析した結果、スプライスソーム形成後の第一段階の反応にATPと、PRP2産物を含めて少なくとも2種類のタンパク因子が、またその後の第二段階の反応にも少なくとも2種類のタ

ンパク因子が必要であることが明らかになった。また、PRP18変異株から調製された抽出液を熱処理して用いると反応は第二段階で止まり、反応中間体が蓄積する (VijayraghavanとAbelson 1990)。蓄積した反応中間体を持ったスプライスソームを分画して第二段階の反応を追跡する実験から、第二段階の反応にATPが必要なことが明らかになった。

HeLa細胞の系では、反応後期の解析に、スプライシング反応をそれぞれ第一段階、または第二段階で停止させる次の二つの方法が用いられている。核抽出液とmRNA前駆体とのインキュベーションを2価イオンのキレート試薬であるEDTAの存在下で行うとスプライスソームは形成されるが、第一段階の反応は起こらない。Abmayrらは(1988)、この事を利用してmRNA前駆体のみを含んだスプライスソームをゲル濾過クロマトグラフィーによって分画して第一段階の反応を追跡し、スプライスソーム形成後の第一段階の反応に、タンパク因子とATPが必要なことを明らかにした。もう一つの方法は、あらかじめ熱処理した核抽出液を用いることである。熱処理した核抽出液を用いると第二段階の反応に必要な因子(HLF)が失活している反応は第二段階で停止する(KrainerとManiatis 1985)。Reedらは(1988)、この事を利用してスプライスソームを蓄積させ、ゲル濾過クロマトグラフィーで分画し、スプライスソームの電子顕微鏡写真を撮ることに成功した。

このようなスプライスソームの中で、イントロンは、二段階の反応を受けて除去されるが、この反応を触媒する因子は未だ明らかにされていない。先にも述べたようにmRNAスプライシング反応経路と、グループIIイントロンのセルフスプライシング反応経路は、非常によく似ている。そのことから、どちらの反応も、基本的には同じ反応機構で起こることが、以前から指摘されている(Sharp 1985、Cech 1986)。つまり、mRNAスプライシング反応も、タンパク因子ではなく、RNAが触媒するエステル交換反応によって起こるという考えである。グループIIイントロンのセルフスプライシング反応には、イントロン内の保存された配列や二次構造が必要である(CechとBassの総説 1986)。しかし、mRNAスプライシング反応に必要な、mRNA前駆体の配列は、5' スプライス部位と、プランチ部位から3' スプライス部位の間の、ごく限られた範囲の配列で、保存された二次構造などは見いだされていない。このことから、mRNAスプライシング反応を触媒するのは、mRNA前駆体ではなく、反応に関与する5種類のsnRNAのどれ

かではないかと考えられた。最近、次に挙げるいくつかの事実から U6snRNA が触媒活性を持つという仮説が提唱された (Brow と Guthrie 1989)。その理由は、一つには、他の snRNA に比べて U6snRNA が生物種間で非常によく保存されていることである (Guthrie と Patterson の総説 1988)。例えば、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) と人の U6snRNA の場合、その配列は 60% 一致する。特に、その中央部の配列は保存度が高く、80% 一致する。第二には、Tani と Oshima (1989) によって報告された分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) の U6snRNA 遺伝子中に存在するイントロンの存在である。このイントロンは mRNA に存在するイントロンと同じ保存配列を持っており、細胞内で mRNA スプライシング反応によって除去されると考えられる。U6snRNA はポリメラーゼ III によって転写されることが知られており、このポリメラーゼによって転写される遺伝子中に存在するイントロンとしては初めての報告であり、進化的にみて、このイントロンの存在は非常に奇妙である。このことから、このイントロンがスプライスソームの中で、スプライシング反応の逆反応によって、触媒活性を担う U6snRNA の活性部位近くに、挿入され、逆転写などの過程を経て遺伝子内に組み込まれたという仮説が提唱された (Brow と Guthrie 1989)。また、U6snRNA の塩基置換変異などを用いた研究から、この snRNA の高度に保存された中央領域が、スプライシング反応活性に非常に重要であることが報告されている (Bindereif ら 1990、Vankan ら 1990、Fabrizio と Abelson 1990)。特に、出芽酵母の場合、分裂酵母でイントロンが挿入されている部位の近傍の配列と、U4snRNA と塩基対合を形成する領域の少し上流の ACAGA 配列が (図 15 参照)、スプライシング反応活性に不可欠であり、これらの配列の塩基置換変異のいくつかを用いると、スプライスソーム形成と、第一段階の反応は起こるが、第二段階の反応が起こらないことが明らかにされている (Fabrizio と Abelson 1990)。以上述べた事実は、U6snRNA がスプライシング反応を触媒するという仮説によく適合しているが、いずれも非常に間接的にこの仮説を支持しているに過ぎない。また、もしこの仮説が正しいのなら、U6snRNA は、スプライスソーム内で、RNA 鎖の切断再結合反応が起こる mRNA 前駆体上の部位に近接し、この部位と直接相互作用するはずであるが、U6snRNA のスプライスソーム内での位置については今まで全く報告されていない。

筆者は、イントロンがスプライスソーム内で、どのようにして除去され

るのかという問題に興味を持ち、この問題を解明するために、まず第二段階の反応に的を絞り、熱処理した核抽出液を用いて、この反応を詳細に解析した。その結果、第二段階の反応にATPと2種類のタンパク因子が必要なこと、そして、スプライシング反応がスプライスソームの数回のコンフォメーションの変化を経て起こることを明らかにした（第一部）。また、核酸と核酸、または核酸とタンパク質の相互作用の解析によく用いられているUVクロスリンク法を用いて、mRNA前駆体とsnRNAとの相互作用について解析した。そして、スプライシング反応を触媒する可能性が指摘されているU6snRNAがスプライスソーム内で、5' スプライス部位に近接して存在していることを明らかにした（第二部）。

第二章 材料と方法

材料

合成DNAは、DNA合成機 (A380, Applied Biosystem) で合成した後、8M尿素を含む10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製した。非標識ヌクレオチド類はPharmaciaから、 m^7 GpppGはNEBから購入した。アクリルアミドは第一化学から購入した。その他の試薬類は、主に和光純薬と半井化学から購入した。

mRNA前駆体の調製

ニワトリ δ クリスタリン遺伝子の14番目と15番目のエキソンの一部とその間のイントロンNをSP6ファージのプロモーターの下流に連結したプラスミド、pSP14-15 (Sawara 1988) を制限酵素SmaI (宝酒造) で直鎖化し、*in vitro* 転写反応の鋳型として用いた。*in vitro* 転写反応は、40mM Tris-HCl (pH7.5)、6mM $MgCl_2$ 、2mM スペルミジン、10mM ジチオスレイトール (DTT)、250 μ M ATP、UTP、CTP、50 μ M GTP、500 μ M m^7 GpppG、2.5 μ g 鋳型 DNA、50 μ Ci [α - 32 P] GTP (400Ci/mmol, Amersham)、50units SP6 RNAポリメラーゼ (宝酒造) を含む20 μ l の反応系で、37度で60分間行なった。転写反応後、8M尿素を含む5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、mRNA前駆体を精製した。

核抽出液および細胞質S100フラクションの調製

HeLa細胞は、0.03%グルタミン、5%ウマ血清を含むイーグルMEM培地 (ニッスイ) を用いて、スピナーフラスコで培養した。

核抽出液および細胞質S100フラクションは、HeLa細胞から、基本的にDignamら (1983) の方法に従って調製した。ただし、ホモゲナイザーは、細胞破壊の際にはkontesのAタイプを、核の懸濁の際には、wheatonのBタイプを用いた。また、塩抽出の際に加えるバッファーCのKCl濃度を0.6Mに変更し、細胞 10^9 個あたり1.3ml加えた。また、プロテアーゼ阻害剤は、PMSFの代わりに、PAMSF (*p*-アミノジフェニルメタンスルホニルフルオ

ライド塩酸塩)を用い、バッファーAとCに0.2mM加えた。また、バッファーDのDTT濃度は2mMにした。

核抽出液の熱処理は、45度で、HLFの活性が検出できなくなるまで(10-16分間)行なった。核抽出液のMNase処理は、Furneauxら(1985)に従って行なった。

固定化していないmRNA前駆体を用いた*in vitro*スプライシング反応

スプライシング反応は、60% HeLa細胞核抽出液、細胞質S100フラクション、カラムクロマトグラフィーのフラクションまたはバッファーD(Dignamら 1983)と1.5mM $MgCl_2$ 、20mM クレアチンリン酸、0.5mM ATPを含む反応液(スプライシング反応液)に、2.5fmol/ μ l以下のmRNA前駆体を加えて、30度で行なった。また、反応液にATPを加えない場合は、クレアチンリン酸も加えていない。なお、図2及び図3の実験ではATPの濃度を0.1mMにした。密度勾配遠心法で分画したフラクションを用いるときには、このフラクションに等量あるいは倍量のスプライシング反応液を加えた。反応後、2XPKバッファー(200mM Tris-HCl (pH7.5)、25mM EDTA、300mM NaCl、2% SDS) 100 μ lと蒸留水を全液量が200 μ lになるように加えて反応を停止させ、100 μ gのプロテアーゼK(Merk)を加えて、反応液中のタンパク質を分解し、フェノール処理、エタノール沈殿によってRNAを回収し、8M尿素を含む6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。

グリセロールの密度勾配遠心法

密度勾配遠心法を行なう際には、30 μ l HeLa細胞核抽出液、30 μ lバッファーD'(20mM Hepes-NaOH (pH7.9)、0.1M KCl、0.2mM EDTA、2mM DTT)、1.5mM $MgCl_2$ 、20mM クレアチンリン酸、0.5mM ATP、250fmol mRNA前駆体を含む100 μ lの反応系でスプライシング反応を行なった。反応後、反応液を、20mM Hepes-NaOH (pH7.9)、50mM KCl、1.5mM $MgCl_2$ 、1mM DTTを含む10-30% グリセロールの密度勾配上に重層し、SW55Tiローターで50,000rpm、105分間、4度で遠心した。遠心後、遠心管の底から9滴を1フラクションとして溶液を集め、各フラクションの放射活性

を測定した。

mRNA前駆体の固定化

約10pmolのmRNA前駆体を150pmolの41merの合成DNA (5'-TTCATCCA TTCATCCATTTCAGGGTACCCGATCAGTAGACAG-3'、斜体文字で表した配列は mRNA前駆体の3'末端に相補的) とを、14mM Tris-HCl (pH7.5)、40mM NaCl、0.2mM EDTAを含む50 μ lの溶液中で、100度で3分間加熱後、40分間で徐々に室温まで冷やして、アニールさせる。その後、14mM MgCl₂、0.4mM dATP、dGTP、アミノアリルdUTP (Sigma)、2mM DTT、40 μ g酵母tRNA、200units RNase阻害剤 (宝酒造)、32units klenow fragment (宝酒造) を含む50 μ lの溶液を加えて、37度で一時間インキュベートし、mRNA前駆体を伸長させる。伸長したmRNA前駆体を、8M尿素を含む4% ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製し、RubyとAbelson (1988) に従って、NHS-LC-biotin (Pierce Chemicals) でビオチン化した。約100fmolのビオチン化したmRNA前駆体を、0.1% NP-40、0.1mg/mlグリコーゲン、1mg/mlウシ血清アルブミン、0.1mg/ml酵母tRNAを含む、バッファーE (12mM Hepes-NaOH (pH7.9)、60mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.12mM EDTA、12%グリセロール) 中で、5 μ lのストレプトアビジンアガロース (BRL) に結合させ、その後、アガロースビーズをバッファーEで洗った。

固定化したmRNA前駆体を用いた*in vitro*スプライシング反応

アガロースビーズ上に固定化したmRNA前駆体を用いたスプライシング反応は、5 μ l以下のアガロースビーズに、20-50 μ lの、固定化していない mRNA前駆体の場合と同様のスプライシング反応液を加え、インキュベーターシェイカー内で30度で振とうしながら行なった。RNaseHとのインキュベーションは、0.2 μ gの合成DNA、2unitsのRNaseH、1.5mM MgCl₂及び12 μ lのバッファーDを含む20mlの反応液を加えて20分間行なった。各インキュベーション後、さらにインキュベーションを行なう場合は、アガロースビーズをバッファーEで5回洗い、新しいチューブに移した。最後のインキュベーションの後、バッファーEでアガロースビーズを洗い、溶出バ

ッファー (0.2M NaOAc (pH5.2)、10mM EDTA、1% SDS) を加え、100度で3分間加熱して、アガロースビーズに結合しているRNAを溶出した。

スプライシング因子の分画

HeLa細胞のS100フラクションは、分画する際には、0.05M KClを含むバッファーF (20mM Hepes-NaOH (pH7.9)、0.1mM EDTA、1mM DTT、10%グリセロール) に対して透析した。S100フラクション (タンパク質濃度20mg/ml、12ml) を0.05M KCl-バッファーFで平衡化したDEAE-celluloseカラム (whatmann DE-52、2.5X8cm) に添加し、フロースルー分画 (DI) を集めた後、カラムを0.05M KCl-バッファーFでよく洗った。次に、カラムを0.2M KCl-バッファーFで溶出し、2mlずつフラクションを集めた。そのうち280nmの吸光度の高いフラクションを集めてDIIフラクションとした。次に、カラムを0.5M KCl-バッファーFで溶出し、280nmの吸光度の高いフラクションを集めてDIIIフラクションとした。DIIフラクションのKCl濃度をバッファーFで薄めて0.1Mに補正してから、0.1M KCl-バッファーFで平衡化したBio-Rex 70カラム (Bio-Rad、2.5X4cm) に添加した。カラムを0.1M KCl-バッファーFでよく洗った後、0.5MKCl-バッファーFで溶出した。280nmの吸光度の高いフラクションを集めて、KCl濃度を0.1Mに補正し、0.1M KCl-バッファーFで平衡化したMono Qカラム (Pharmacia、1ml) に添加した。カラムを5mlの0.1M KCl-バッファーFで洗った後、0.1M KCl-バッファーFから0.5M KCl-バッファーFの直線型濃度勾配で溶出し、0.5mlずつフラクションを集めた。各フラクションのHLFの活性を、熱処理した核抽出液との相補実験により検定した。具体的には、熱処理した核抽出液を用いた5 μ lのスプライシング反応液を60分間インキュベートした後、各フラクションを用いた10 μ lのスプライシング反応液を加えて、さらに10分間インキュベートした。反応産物を電気泳動によって解析し、mRNAが産生されたフラクションをHLFフラクションとして集めた。

UV照射によるクロスリンク実験

2.5fmol/ μ lのmRNA前駆体を含むスプライシング反応液を30度で所定の時間インキュベートした後、バッファーEで20倍に薄め、Stlatalinker (

Stlatagene) を用いて氷上で強度 $250,000\mu\text{J}/\text{cm}^2$ 、波長 254nm の紫外線を照射した。UV照射後、等量の2XPKバッファーと、プロテアーゼK及びプロナーゼ (Calbiochem) を共に $250\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加えて 37°C で30分間インキュベートした後、再びプロテアーゼKとプロナーゼを加えてインキュベートし、フェノール処理、エタノール沈殿によってRNAを回収した。RNaseHで処理する場合には、回収したRNAを $12\mu\text{l}$ のバッファーDと $20\mu\text{g}$ の酵母tRNAを含む $20\mu\text{l}$ の溶液中で、 $0.2\mu\text{g}$ の合成DNAと、 70°C で3分間加熱後、10分間室温に放置してアニールさせた後、RNaseHと MgCl_2 をそれぞれ $50\text{units}/\text{ml}$ 、 1.5mM になるように加え 30°C で10分間インキュベートした。精製したクロスリンク産物をRNaseHで処理する場合にも、同様にした。RNAの解析は、 8M 尿素を含む 4.5% のポリアクリルアミドゲル電気泳動で行なった。

第三章 実験結果

第一部 スプライシング反応の第二段階の解析

a) 第二段階の反応のATP要求性

筆者らのグループではニワトリ δ クリスタリン遺伝子 (Ohnoら 1985) の14番目と15番目のエキソンの一部とその間のイントロンを持つmRNA前駆体 (δ EX14-15) をSP6ファージのRNAポリメラーゼを用いて *in vitro* で合成し、スプライシング反応の基質として用いている。合成されるmRNA前駆体の構造を図2 Aに示した。このmRNA前駆体をHeLa細胞から調製した核抽出液とATP存在下でインキュベートするとスプライシング反応が起こり反応中間体である5' エキソンRNAとラリアット型中間体や、反応産物であるmRNAとラリアット型イントロンが産生される (図2 B レーン2)。これらのRNAの構造はSakamotoら (1987) によって決定されている。核抽出液とのインキュベーションの際、ATPを加えないと反応は全く起こらない (レーン3)。核抽出液をあらかじめ45度で熱処理してから、mRNA前駆体とインキュベートすると、過去に報告されたように (KrainerとManiatis 1985)、第一段階の反応だけが起こり二種類の反応中間体が蓄積する (レーン4)。またこの反応もATPを加えないと起こらず (レーン5)、過去に報告された (HernandezとKeller 1983、Hardyら 1984、Krainerら 1984) 第一段階のATP要求性が確認された。

スプライシング反応の第二段階の反応を解析するには第一段階の反応と分けて解析する必要がある。そこで、熱処理した核抽出液で第一段階の反応を行わせた後、熱処理していない通常の核抽出液を加えて熱に弱い因子を供給し、第二段階の反応を行わせた (図2 C)。通常の核抽出液と共にATPを加えると第二段階の反応が10分間で効率よく起こり mRNAが産生された (レーン2)。なお、通常の *in vitro* スプライシング反応ではmRNA前駆体を核抽出液と混合してから10分間では反応が全く起こらないので (図1 B レーン1)、この時の反応産物は熱処理した核抽出液によってすでに産生されていた反応中間体に由来していると考えられる。つまり、この方法で、第一段階の反応を介さない第二段階の反応を特異的に解析することができる。通常の核抽出液を加えるときに、ATPと共に加水分解できない

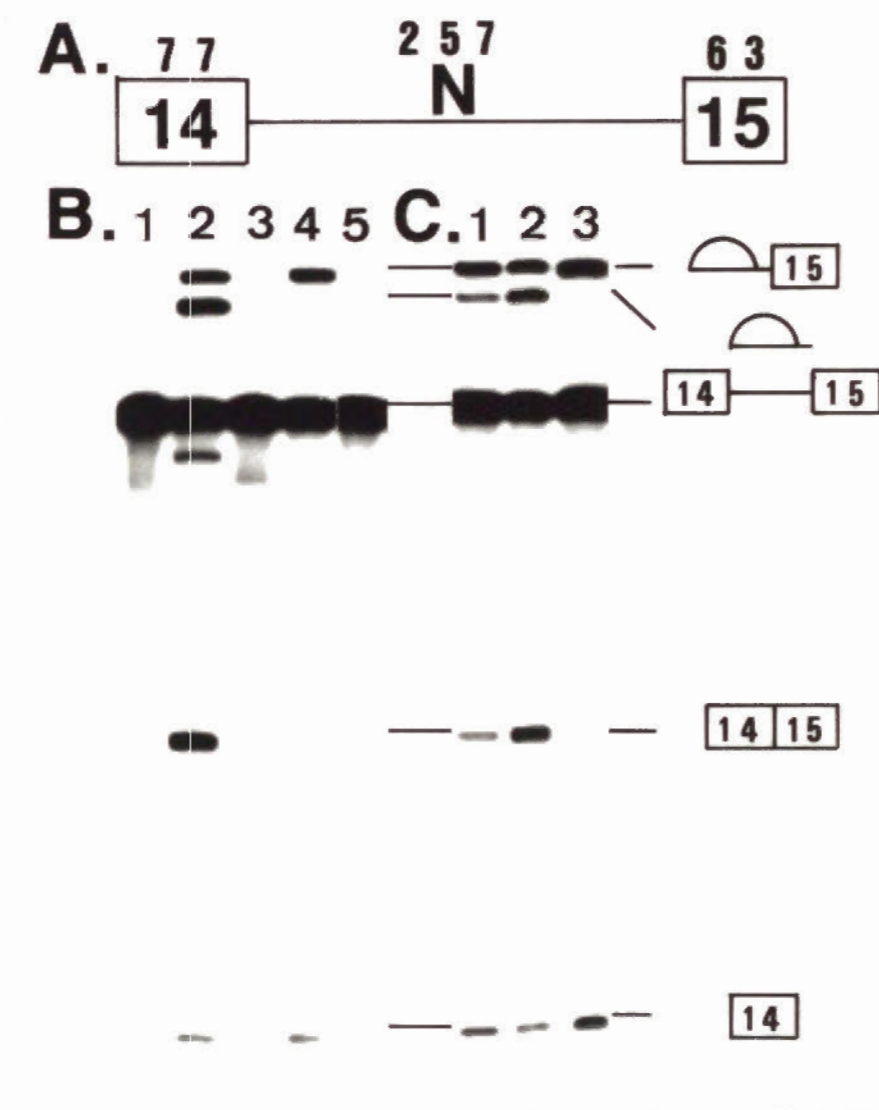


図2. 第二段階の反応のATP要求性（次頁に続く）

図2. 第二段階の反応のATP要求性

A) 実験に用いたmRNA前駆体 (8EX14-15) を5' 側が左になるように模式的に表した。箱がエキソンを、箱の間の直線がイントロンを示している。箱の中の数字と直線の上のアルファベットは、それぞれ δ クリスタリン遺伝子 (Ohnoら 1985) の特定のエキソンとイントロンを表している。各エキソン、イントロンの長さをそれぞれの上に数字 (ヌクレオチド長) で示した。 B、C) ^{32}P で標識したmRNA前駆体を核抽出液とインキュベートした後、RNAを回収し、8M尿素を含む6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、オートラジオグラムを撮った。RNA産物の構造を図の右に模式的に示した。 B) mRNA前駆体を、ATP存在下で通常の核抽出液と10分間 (レーン1)、30分間 (レーン2)、熱処理した核抽出液と60分間 (レーン4)、またはATPを加えないで通常の核抽出液と30分間 (レーン3)、熱処理した核抽出液と60分間 (レーン5) インキュベートした。 C) ATP存在下で熱処理した核抽出液と60分間インキュベートした後、通常の核抽出液を用いたATPを含まない (レーン1) またはATPを含む (レーン2、3) 等量の反応液を加えて10分間インキュベートした。レーン3では加えた反応液に1mMのAMPPCPが含まれる。

ATPの類似体である β - γ メチレンATP (AMPPCP) を加えると、第二段階の反応はほぼ完全に阻害された (図2 C レーン3)。このことは第二段階の反応にATPが必要なことを示している。また、通常の核抽出液を加える時にATPを加えないと、第二段階の反応はほとんど起こらない (レーン1)。この時わずかに観察されるmRNAは、第一段階の反応の際に加えたATPが残っていたため産生されたと考えられる。

以上の実験で観察された第二段階の反応が、熱処理した核抽出液によって形成されたスプライスソームから起こったことを確認するため以下の実験を行った。標識したmRNA前駆体を通常の核抽出液でスプライシング反応を行わせた後、グリセロールの密度勾配遠心法によって反応液を分画し、それぞれの分画の放射活性を測定すると、65S、45S、20Sのピークが観察された (図1 6 参照)。そこに含まれるRNAの解析や過去の報告 (Grabowskiら 1985、FrederickとKeller 1985) から65Sがスプライスソーム、45Sがプレスプライスソーム、20Sは非特異的な複合体だと考えられる。熱処理した核抽出液を用いて60分間インキュベートした場合には65S、30Sの複合体が観察された (図3 A)。65SのフラクションからRNAを回収して解析すると反応中間体が多く観察され (図3 B レーン1)、この複合体がスプライスソームであることがわかった。30Sフラクションには、反応中間体は見られず (レーン7)、非特異的な複合体を含んでいると考えられる。なお、60分間のインキュベーションでは、プレスプライスソームは観察されなかったが、30分間のインキュベーションでは45Sのピークとして観察できる (データは示さず)。

これらの複合体から、第二段階の反応が起こるかを調べるため、グリセロールの密度勾配遠心法によって分画した65S、45S、30Sのフラクションに通常の核抽出液を加えて10分間インキュベートした。ATP存在下では、スプライスソームを含む65Sフラクションでのみ第二段階の反応が観察され (図3 B レーン2、5、8)、図2 Cの実験で観察された第二段階の反応がスプライスソームから起こったことが確認された。しかし、ATP非存在下では65Sフラクションを用いても反応は全く起こらず (レーン3)、第二段階の反応がATPに依存して起こることが確認された。また、65Sフラクションでの第二段階の反応は、核抽出液を加えないと、ATP存在下でも起こらないため (データは示さず)、第二段階の反応にはATPと共に核抽出液中の因子が必要なことがわかった。

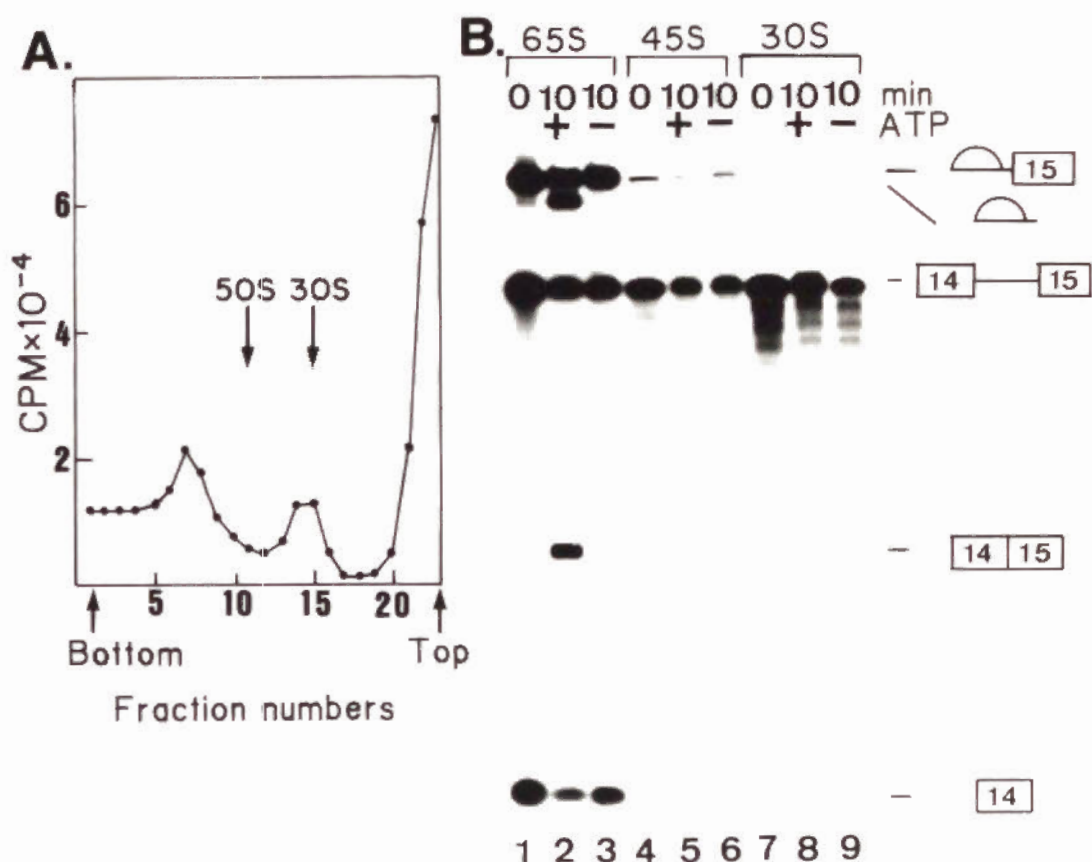


図3. 熱処理した核抽出液で形成されたスプライソームからの第二段階の反応

A) mRNA前駆体を熱処理した核抽出液と60分間インキュベートした後、反応液をグリセロールの密度勾配遠心法によって分画後、各フラクションの放射活性を測定した。大腸菌のリボソームサブユニットの分画される位置をマーカーとして示した。B) Aのフラクション7 (65S)、フラクション11 (45S)、フラクション15 (30S) をそれぞれ3等分し、通常の核抽出液を含む等量の反応液とATP非存在下 (レーン3、6、9)、ATP存在下 (レーン2、5、8) で10分間インキュベート後、あるいはインキュベートせずに (レーン1、4、7) RNAを回収し、電気泳動によって解析した。

以上の実験より第二段階の反応にはATPと核抽出液中の因子が、第一段階の反応後、新たに必要ことが明らかになった。最近、Reedらは（1988）、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いてスプライスソームを分画し、第二段階に必要な核抽出液中の因子は、マイクロコッカスのヌクレアーゼ（MNase）に耐性のタンパク因子で、HeLa細胞から調製した細胞質S100フラクション中にも活性が見られることを明らかにしている。筆者は、次に、このタンパク因子の解析を試みた。

b) 第二段階の反応に必要なスプライシング因子

熱に弱い因子HLF（SF3、KraimerとManiatis 1985）が、熱処理した核抽出液で形成されたスプライスソームからの第二段階の反応に必要なことは明らかである。そこで、まず、この因子をS100フラクションから3種類のカラムクロマトグラフィーによって部分精製した。精製の過程を図4Aに示した。HLF活性の検定には熱処理した核抽出液との相補実験を用いた。具体的には、熱処理した核抽出液を用いて第一段階の反応を行った後、各フラクションとATPを加えて第二段階の反応が起こるかどうかで検定した。

図3の実験と同様にして、熱処理した核抽出液によって形成されたスプライスソームをグリセロールの密度勾配遠心法によって分画し、部分精製したHLFとATPを加えてインキュベートしても第二段階の反応は観察されなかった（図4Bレーン5）。しかし、HLFと共にDEAE-celluloseカラムクロマトグラフィーのフローズルーフラクション（DI）と500mM KCl溶出フラクション（DIII）を加えると第二段階の反応が効率よく起こり、mRNAが産生された（図4Bレーン9）。しかし、3つのフラクションのいずれを欠いても反応はほとんど起こらなかった（レーン3-8）。この結果は、グリセロールの密度勾配遠心法によって分画したスプライスソームからの第二段階の反応にはHLFに加えて、DIフラクションに存在する因子（DEAE-I）と、DIIIフラクション中の因子（DEAE-III）が必要なることを示している。

以上の実験により、第二段階の反応にはATPと3種類のタンパク因子が必要なることが示唆された。筆者は、次に、これらの諸因子がどのようにスプライスソームに作用して第二段階の反応が起こるのかを解析するために、mRNA前駆体をアガロースビーズ上に固定化して、スプライシング反応の

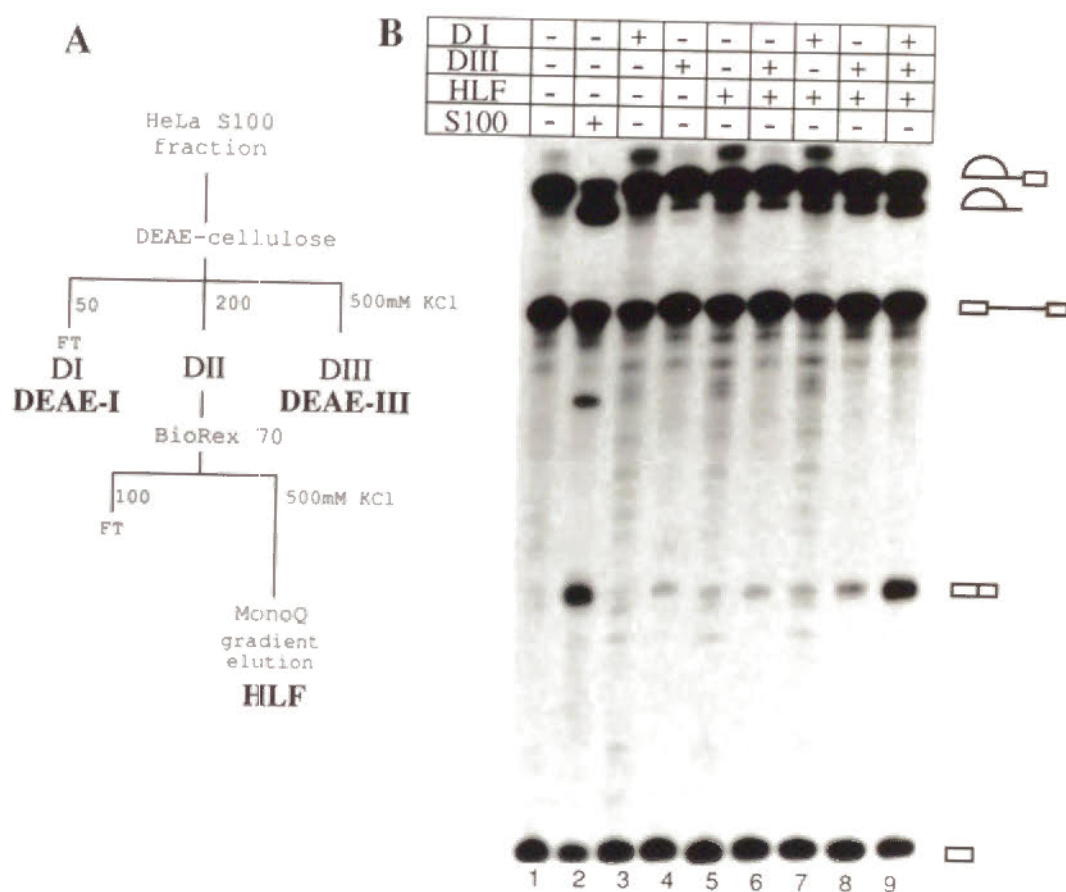


図4. 第二段階の反応に必要な因子の分画

A) HeLa細胞の細胞質S100フラクションからの各因子の分画過程を示した。カラムに添加した試料、または溶出バッファのKCl濃度を図中に数字で示した。FTはフロースルー分画を表す。図3と同様の実験によって分画した65Sのフラクション10 μ lに20 μ lのスプライシング反応液を加えて、10分間（レーン2）または30分間（レーン1、3-9）インキュベートした後、RNAを回収し、電気泳動した。反応液は、S100、DI、DIII、HLFフラクションのうち各レーンの上に+で示したフラクションを、単独の場合は12 μ lずつ、2種類の場合は6 μ lずつ、3種類の場合は4 μ lずつ含んでいる。レーン1の試料はバッファードを用いた反応液とインキュベートした。

基質とする方法を開発した。この方法を用いれば、第二段階に必要な諸因子を順次加えることにより、諸因子の第二段階での作用機序について解析できる。

c) mRNA前駆体の固定化

mRNA前駆体を固定化する方法としては、mRNA前駆体を合成する際にビオチンUTPを直接取り込ませてストレプトアビジンアガロースに固定化する方法が考えられる。しかし、この方法では、mRNA前駆体のどこがビオチン化されるかわかるらない。もし、スプライス部位などの反応に重要な配列にビオチンが取り込まれれば、スプライシング反応は阻害されてしまうと考えられる。このような可能性を除外するために、mRNA前駆体の3'末端を特異的にビオチン化して固定化することを考えた。用いた固定化の方法を図5 Aに示した。mRNA前駆体と合成オリゴヌクレオチドをアニールさせ、Klenow fragmentを用いてmRNA前駆体の3'末端に、デオキシヌクレオチドを付加する。この時、dTTPの代わりに、AA-dUTPを取り込ませる。デオキシヌクレオチドが付加されたRNAを電気泳動によって分離し、ビオチン化試薬で、取り込まれたAA-デオキシウリジン残基をビオチン化する。次にビオチン化したRNAをストレプトアビジンアガロースに結合させる。このようにして固定化したmRNA前駆体は核抽出液によって効率よくスプライシング反応を受けmRNAが産生された(図5 B レーン1)。この時同時に産生されたラリアット型イントロンは、ビオチンを持っていないため、アガロースビーズから離れて、ビーズをバッファーで洗った時の上清に観察された(図5 B レーン2)。反応中間体である5'エキソンRNAも、ビオチンを持っていないが、上清には観察されず、アガロースビーズ上に観察される(レーン1)。これは、5'エキソンRNAがスプライスソームを介してラリアット型中間体とアソシエートしていることを示している。

d) 第二段階の反応の二つの過程への分解

固定化したmRNA前駆体を熱処理した核抽出液とインキュベートすると、固定化していない場合と同様、第一段階の反応のみが起こり反応中間体が

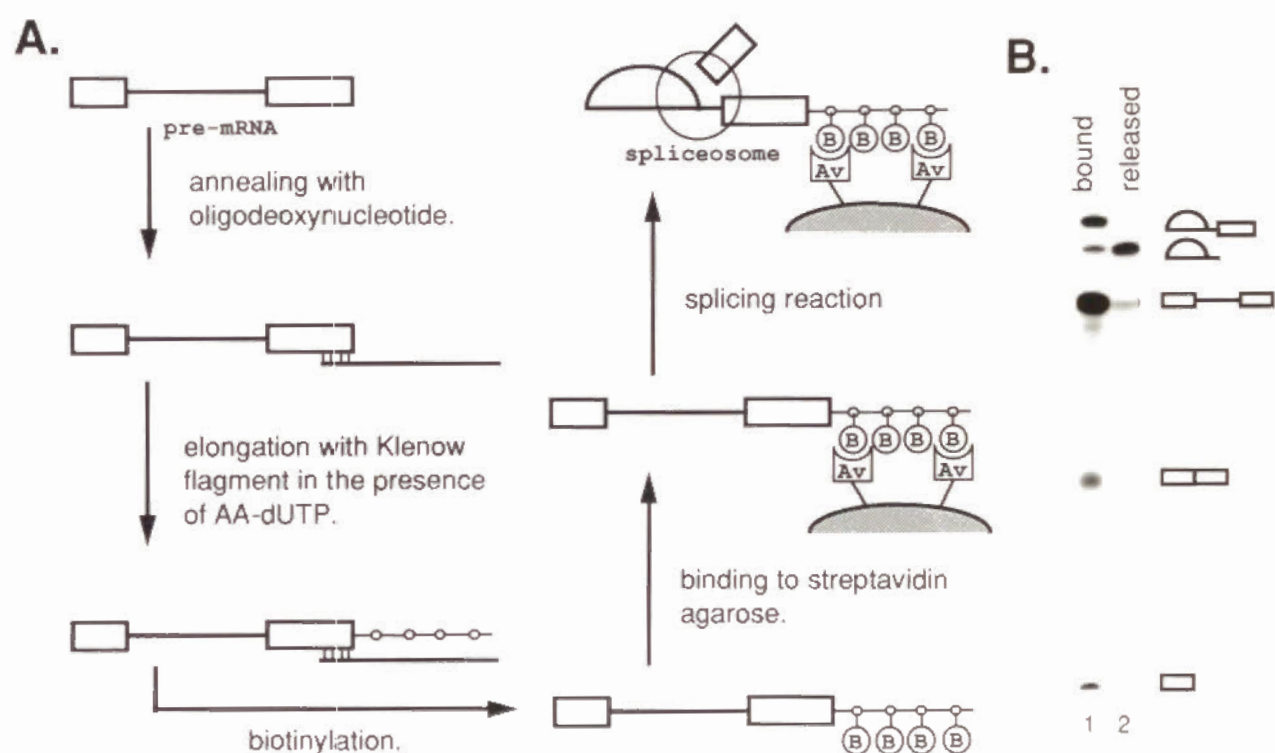


図5. mRNA前駆体の固定化

A) mRNA前駆体を固定化する方法を模式的に示した。B) 固定化したmRNA前駆体を核抽出液と30分間インキュベートした後、アガロースビーズから(レーン1)、またはアガロースビーズを洗った時の最初の上清から(レーン2) RNAを回収して、電気泳動した。

蓄積する（図6 レーン1）。前述のように、第二段階の反応にはタンパク因子とATPが必要である。そこで、第一段階の反応の後、タンパク因子とATPを順番に加えて第二段階の反応が起こるかどうか調べてみた。この実験では、タンパク因子として、部分精製した因子ではなく、MNaseによって第一段階の反応に必要なsnRNAを壊した核抽出液を用いた。熱処理した核抽出液との1回目のインキュベーションの後、アガロースビーズをよく洗って遊離の因子を除き、MNaseで処理した核抽出液を加えて2回目のインキュベーションを行っても、ATPを同時に加えないと第二段階の反応は起こらない（図6 レーン2）。しかし、MNaseで処理した核抽出液との2回目のインキュベーションの後、アガロースビーズを再びよく洗い、今度はATPのみとインキュベートすると第二段階の反応が効率よく起こりmRNAが産生された（レーン3-7）。mRNAは、ATPとわずか2分間インキュベートしただけで観察され、1時間後には半分近くの間体が第二段階の反応を受けた。MNaseで処理した核抽出液との2回目のインキュベーションの後、バッファーでよく洗っても、アガロースビーズ上にごくわずかの因子が非特異的に結合していることが考えられるが、そのような微量の因子に依存して、ここで観察された効率のよい反応が起こることは考えにくい。また、そのような非特異的な因子は、MNaseで処理した核抽出液との2回目のインキュベーションを、たとえ4度で行っても同様に残っているはずだが、この場合にはATPとインキュベートしても第二段階の反応は起こらなかった（図6 レーン8）。これらの結果は、第二段階の反応は、タンパク因子に依存した過程と、ATPのみに依存する過程の二つの過程に分けられることを示している。

なお、この実験で第二段階の反応によって産生されたラリアット型イントロンは、ビオチン化されていないのに、アガロースビーズ上にはっきりと観察される（レーン3-7）。このことは、スプライシング反応を受けたmRNAとラリアット型イントロンが、この条件では、解離せずに、1つの複合体中に共存している事を示している（後述）。

熱処理した核抽出液で第一段階の反応を行うと、反応中間体を持つ65Sのスプライスソームが蓄積することは前に述べた（図3 A参照）。このスプライスソームと、その後MNaseで処理した核抽出液とインキュベートして形成されたスプライスソームとは機能的に異なっている。前者が第二段階の反応を行うにはタンパク因子とATPが必要だが、後者はATPのみを必

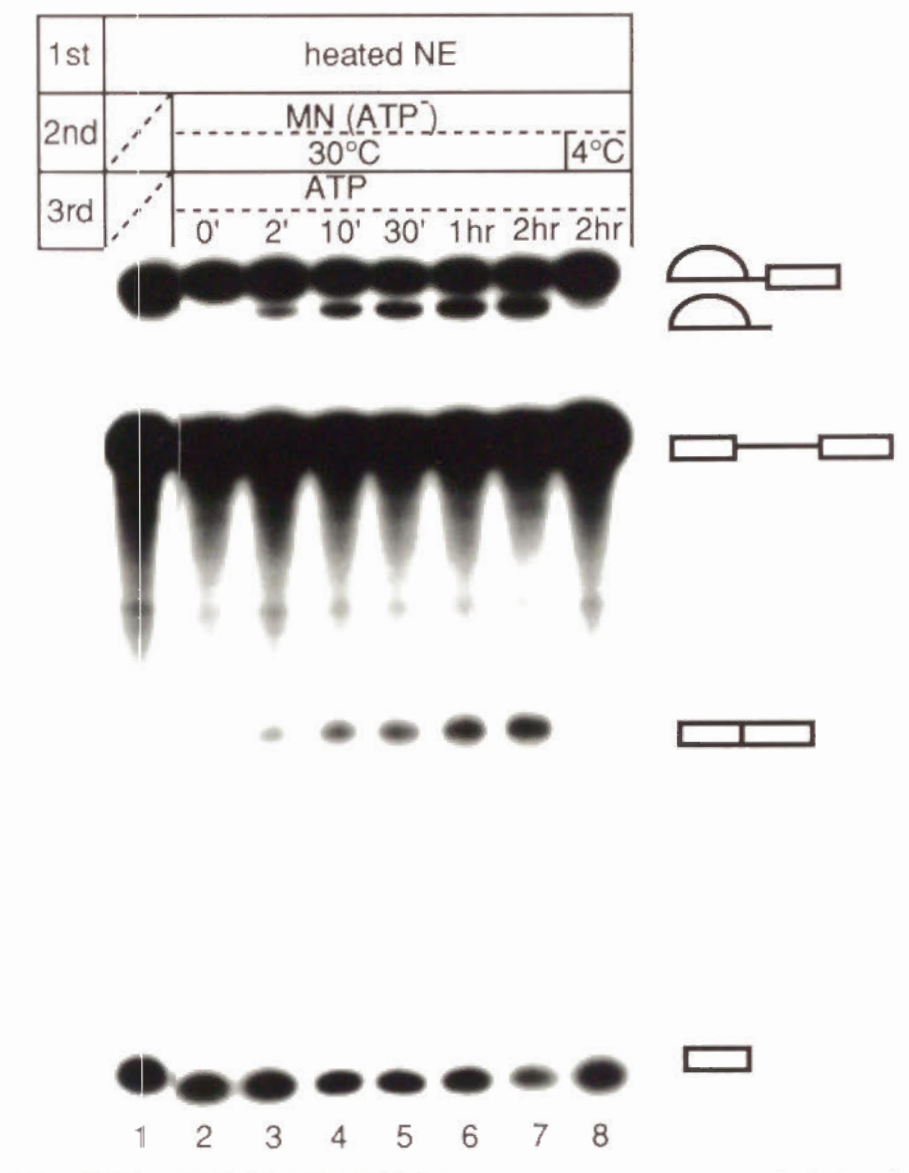


図6. 第二段階の反応におけるタンパク因子に依存する過程と、ATPに依存する過程

固定化したmRNA前駆体を、最初に熱処理した核抽出液と90分間インキュベートした。2回目のインキュベーションはMNaseで処理した核抽出液とATP非存在下で10分間、30度（レーン2-7）または4度（レーン8）で行った。3回目のインキュベーションは1mMのATPを含むバッファーEと、各レーンの上に示した時間行った。インキュベーション後、RNAを回収して電気泳動した。斜めの点線は、それ以上インキュベートしなかったことを表す。NEは核抽出液を、MNはMNaseで処理した核抽出液を表す。

要とする。前者をスプライソームIIa、後者をスプライソームIIbと呼ぶことにする。スプライソームIIbは第二段階の反応に必要な全てのタンパク因子を持っており、ATPを加えただけで第二段階の反応が起こると考えられる。

e) スプライソームIIb形成に必要な因子

前実験では第二段階の反応に必要な因子として、MNaseで処理した核抽出液を用いてスプライソームIIbを形成させた。この時スプライソームIIaに作用する因子としては、図4の実験で分画した3種類の因子（DEAE-I、DEAE-III、HLF）であると予想される。このことを調べるために、まず固定化したmRNA前駆体を用いた実験系でも、第二段階の反応にそれらの因子が必要であるかどうか調べた（図7A）。熱処理した核抽出液で第一段階の反応を行わせた後、アガロースビーズを洗い、部分精製した各因子を単独、あるいは組み合わせて加えた。当初の予想に反して、DEAE-IとHLFを加えただけで第二段階の反応が効率よく起こり（図7Aレーン4）、これにDEAE-IIIを加えても反応効率は変わらなかった（データは示さず）。この結果は、第二段階に新たに必要な因子はDEAE-IとHLFであり、DEAE-IIIはすでにスプライソーム内に存在していることを示している。おそらく、図4の実験においては、DEAE-IIIは、グリセロールの密度勾配遠心法の際にスプライソームから解離したために、新たに必要になったと考えられる。言い替えれば、DEAE-IIIは、おそらく第一段階の反応前にスプライソーム内に存在し、第二段階の反応に必要な因子であると考えられる。

以上のように、第二段階に新たに必要な因子はDEAE-IとHLFであることがわかったので、この2種類の因子を用いて図6の実験のように、第二段階の反応を二つの過程に分けることを試みた（図7B）。熱処理した核抽出液による第一段階の反応の後、DEAE-IとHLFとで、ATPを加えずにインキュベートし、その後で、ATPのみとインキュベートした。すると、第二段階の反応が起こりmRNAが産生された（図7Bレーン3）。この結果は、DEAE-IとHLFが、スプライソームIIaにATPに依存せずに作用して、スプライソームIIbが形成されることを示している。

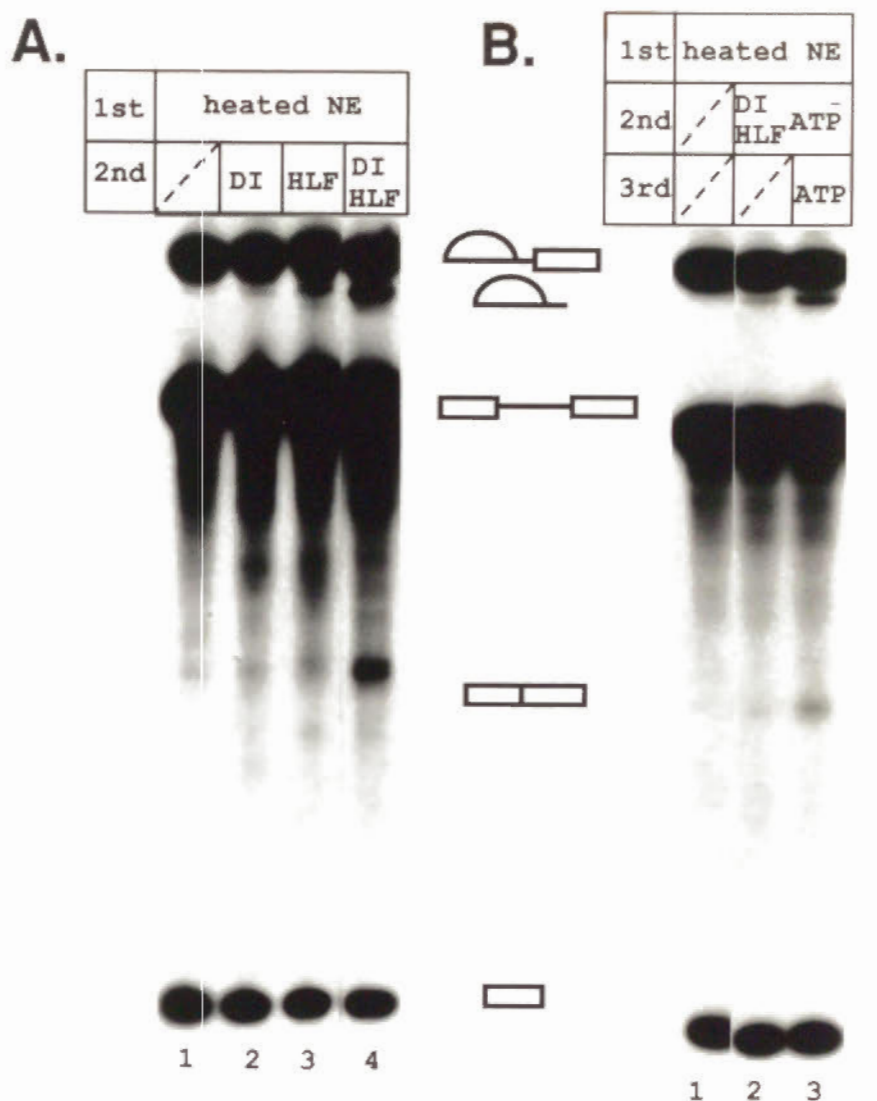


図7. スプライスソームIIbの形成に必要な因子

A) 固定化したmRNA前駆体を、最初に熱処理した核抽出液と90分間インキュベートした。2回目のインキュベーションは、12 μ lのDIフラクション（レーン2）、12 μ lのHLFフラクション（レーン3）、または6 μ lのDIフラクションと6 μ lのHLFフラクション（レーン4）を含む20 μ lの反応液と30分間行った。反応後RNAを回収し電気泳動した。B) 最初のインキュベーションはAと同じ。2回目のインキュベーションは等量のDIフラクションとHLFフラクションを含む反応液と30分間行った。3回目のインキュベーションは、1mMのATPを含むバッファーEと60分間行った。反応後、RNAを回収し、電気泳動した。

f) 3' スプライス部位領域のRNaseHに対する感受性の変化

以上の実験から、第二段階の反応は2種類のスプライスソーム、IIaとIIbを経て起こることが示された。第二段階の反応機構を理解するためには、これらのスプライスソームの構造上の違いを明らかにすることは重要である。第二段階の反応では、3' スプライス部位でRNA鎖の切断再結合反応が起こるので、これらのスプライスソーム内の3' スプライス部位に、この部位を認識する因子や、反応を触媒する因子が結合していることが考えられる。そこで、この部位にスプライスソームの構成因子が結合しているかどうかを、この部位のRNaseHに対する感受性を指標にして調べた(図8)。

固定化したmRNA前駆体を熱処理した核抽出液とインキュベートして、第一段階の反応を行わせた後、アガロースビーズをよく洗って、RNaseHと、3' スプライス部位領域に相補的な合成DNAを加えた(レーン2)。すると、ラリアット型中間体はほとんど観察されなくなり、代わって、ラリアット型イントロンと同様の移動度を示すRNAが観察された。反応液中にはスプライシング反応を行うのに必要な核抽出液もATPも含まれていないので、このRNAはラリアット型中間体がRNaseHによって切断された産物だと考えられる。この結果は、熱処理した核抽出液によって第一段階の反応を受けたスプライスソームIIaの3' スプライス部位には、因子が結合しておらず露出していることを示している。これに対し、スプライスソームIIaにMNaseで処理した核抽出液を加えて、スプライスソームIIbを形成させてからRNaseHと合成DNAを加えると、切断されないラリアット型中間体が観察された(図8レーン3)。そして、RNaseHとのインキュベーションの後に、ATPのみとインキュベーションを行うと切断されなかったラリアット型中間体から第二段階の反応が起こり、mRNAが産生された(レーン4)。このことはRNaseHによって切断されなかったラリアット型中間体がスプライスソームIIbを形成していたことを示している。つまり、スプライスソームIIaの場合とは異なり、スプライスソームIIbの3' スプライス部位領域にはおそらくスプライスソームの構成因子が結合しており、RNaseHに対して耐性になっていることを示している。なお、この実験でRNaseHによって切断されたRNA断片のうち5'側の断片は、ビオチンを持っていないがアガロースビーズ上に顕著に観察された。この理由は全く不明であるが、3'エキソンに結合する因子が存在し、この因子を介して5'側のRNA断片が

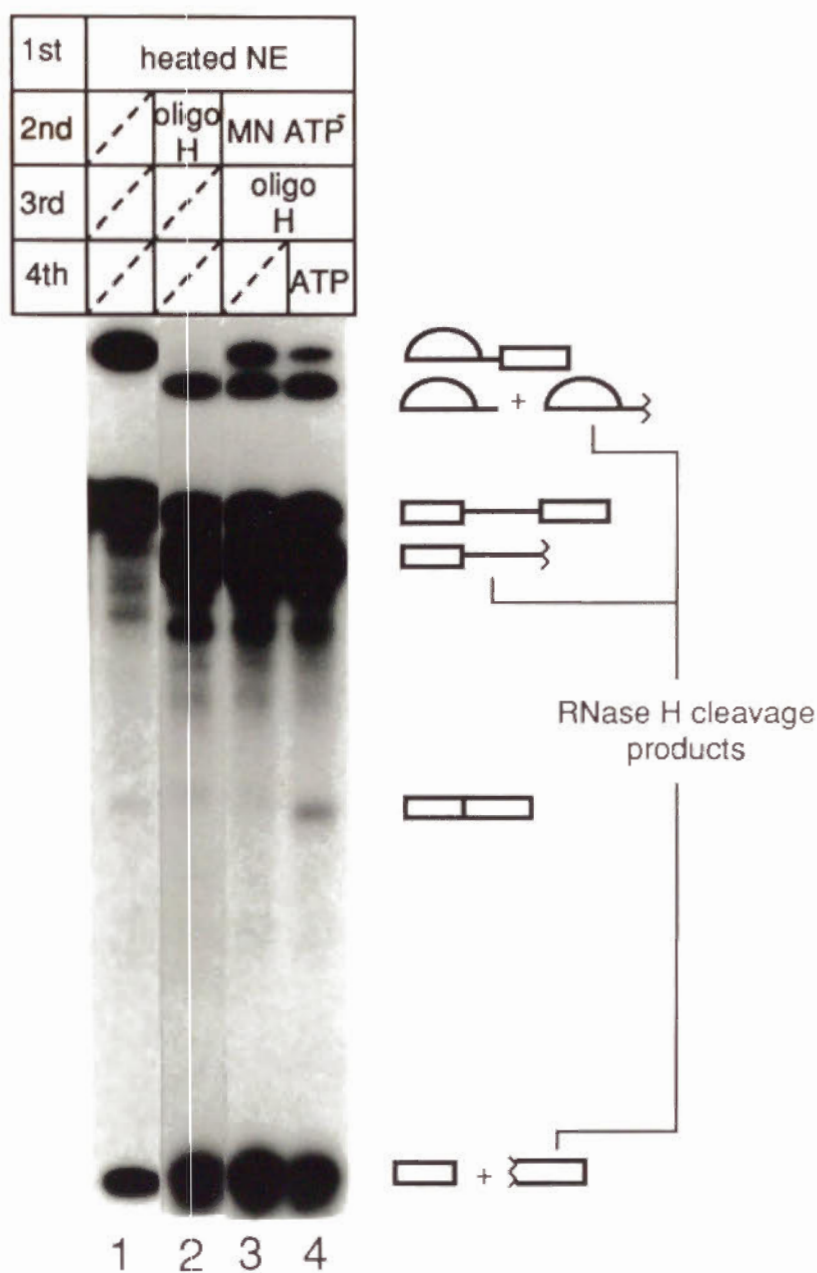


図8. スプライソームIIaとIIbの3' スプライス部位領域のRNaseHに対する感受性

固定化したmRNA前駆体を、最初に熱処理した核抽出液と90分間インキュベートした。2回目のインキュベーションは合成DNA (oligo) の存在下でRNaseH (H) と20分間 (レーン2)、またはMNaseで処理した核抽出液とATP非存在下で10分間 (レーン3、4) 行った。3回目のインキュベーションは合成DNAの存在下でRNaseHと20分間行った。4回目のインキュベーションは、1mM ATPを含むバッファーEと60分間行った。合成DNA (16mer) はmRNA前駆体の3' スプライス部位領域 (3' スプライス部位に対して-8から+8ヌクレオチドの配列) に相補的である。

ビオチンを持っている3'側の断片とアソシエートしているためかもしれない。

g) 通常の核抽出液を用いたスプライシング反応での3' スプライス部位領域のRNaseHに対する感受性の変化

以上の実験結果は第二段階の前期と後期で3' スプライス部位領域のRNaseHに対する感受性が変化することを示している。今までは熱処理した核抽出液を用いた実験系で解析してきたが、この結果が熱処理していない通常の核抽出液を用いたスプライシング反応に対しても当てはまるかどうか解析した(図9)。

*in vitro*スプライシング反応では、スプライスソーム形成に時間がかかるために、核抽出液とインキュベーションを始めてもすぐには反応は起こらず、14分間インキュベートすると初めてラリアット型中間体が観察されるようになる(レーン1)。つまり、この時産生されたラリアット型中間体は第二段階の初期のスプライスソームを反映していると考えられる。この反応を行わせてから、RNaseHと3' スプライス部位領域に相補的な合成DNAを加えると、ラリアット型中間体は全て切断された(レーン2)。これに対し、核抽出液とのインキュベーションを16分間に延ばし、スプライシング反応をさらに進行させてから、RNaseHを加えると、スプライスソームIIbの場合のように、切断されないラリアット型中間体が観察された(レーン5)。この結果は、通常のスプライシング反応の第二段階においても、3' スプライス部位のRNaseHに対する感受性が、反応の前期と後期で変化することを示している。

これまで第二段階の反応過程のみを解析してきたが、第一段階の反応前のスプライスソーム内の、3' スプライス部位領域の状態についても解析した。固定化していないmRNA前駆体を核抽出液と14分間反応後、グリセロールの密度勾配遠心法で解析すると、まだ反応を受けていないmRNA前駆体を持つスプライスソームが観察される(データは示さず)。このスプライスソームを、不均一な複合体だと考えられるが、総称してスプライスソームIと呼ぶことにする。おそらく、同様の複合体が固定化したmRNA前駆体を核抽出液と14分間インキュベートした場合にも形成されていると考えられる。この時、3' スプライス部位領域に相補的な合成DNAとRNaseH

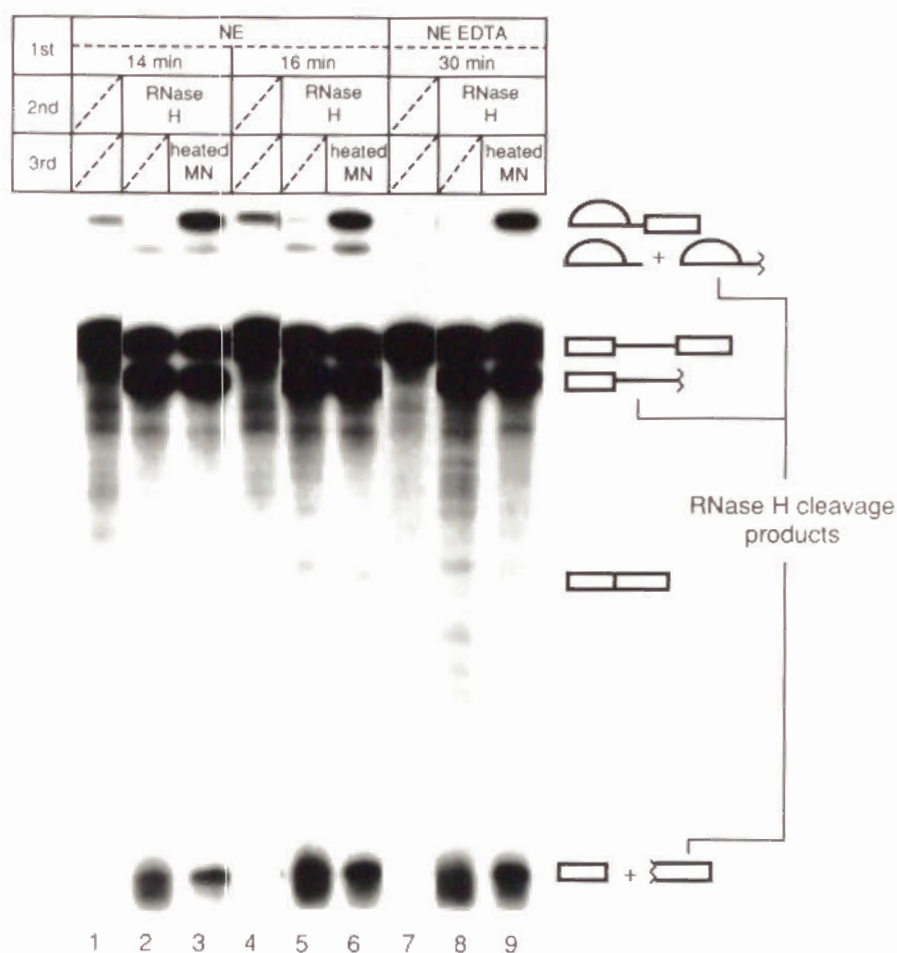


図9. 通常の核抽出液を用いたスプライシング反応での3' スプライス部位領域のRNaseHに対する感受性

固定化したmRNA前駆体を、最初に通常の核抽出液と標準条件で14分間（レーン1－3）、16分間（レーン4－6）、または2.5mM EDTAの存在下で30分間（レーン7－9）行った。2回目のインキュベーションは図8の実験で用いた合成DNAの存在下でRNaseHと20分間行った。3回目のインキュベーションは、熱処理してなおかつMNaseで処理した核抽出液と標準条件で30分間行った。

を加えると、mRNA前駆体のうち約半分が切断されずに残った（図9 レーン2）。このようなRNaseHに対して耐性のmRNA前駆体は、核抽出液とのインキュベーションの際にATPを加えないと観察されないことから（データは示さず）、何らかのスプライシング因子が3' スプライス部位領域に結合したために、RNaseHに対して耐性になったと考えられる。RNaseHによって切断されなかったmRNA前駆体の中に、スプライスソームIを形成している分子が含まれているかどうかを調べるために、RNaseHとのインキュベーションの後、熱処理してなおかつMNaseで処理した核抽出液とインキュベートした。この核抽出液を用いれば、スプライスソーム形成に必要なsnRNPを壊してあるので、スプライスソームをすでに形成しているmRNA前駆体が存在する時のみ、第一段階の反応が観察されることが考えられる。図9に示すように（レーン3）、RNaseHとインキュベートした後、熱処理してなおかつMNaseで処理した核抽出液とインキュベートすると、第一段階の反応が効率よく起こり、反応中間体が産生された。このことは、RNaseHに対して耐性であったmRNA前駆体の中に、スプライスソームIを形成している分子が含まれていることを示している。つまり、スプライスソームIの3' スプライス部位領域はRNaseHに対して耐性であると考えられる。この結果は、核抽出液との1回目のインキュベーションを16分に伸ばした場合にも当てはまった（図9 レーン6）。

また、核抽出液とのインキュベーションをEDTA存在下で行った場合にも同様の結果が得られた。既に報告されたように（Abmayrら 1988）、この条件では、スプライスソームは形成されるが第一段階の反応は起こらない（図9 レーン7）。この条件でスプライスソームを形成させ、RNaseHで処理してから、熱処理してなおかつMNaseで処理した核抽出液とインキュベートすると、反応中間体が産生された（レーン9）。この結果は、EDTA存在下で形成されたスプライスソームの3' スプライス部位領域もRNaseHに対して耐性であることを示している。

h) スプライシング産物解離因子

図6の実験で、産生されたラリアット型イントロンが反応後も、アガロースビーズ上の複合体にアソシエートしていることが示された。これは、通常のスプライシング反応では、ラリアット型イントロンがアガロースビ

ーズから解離して、アガロースビーズを洗った時の上清に観察されたのと対照的である（図5B）。図6の実験では、第二段階の反応を、ATPのみで核抽出液を加えずに行わせたことを考えると、この結果は、スプライシング反応が終わった後で、スプライスされたmRNAとラリアット型イントロンが、解離するためには、核抽出液中の因子が必要なことを示唆している。このような因子を検索するために、次の実験を行った（図10）。

熱処理した核抽出液で第一段階の反応を行った後、MNaseで処理した核抽出液とATPを同時に加えて、第二段階の反応を行わせると、産生されたラリアット型イントロンは、アガロースビーズ上の複合体から解離し、上清中に効率よく観察される（図10レーン3）。また、MNaseで処理した核抽出液の代わりにS100フラクションを用いても同様の結果が得られた（データは示さず）。これは、mRNAとラリアット型イントロンを解離させるために必要なタンパク因子が核抽出液やS100フラクション中に存在していることを示している。これに対し、図6の実験と同様に、第二段階の反応を、タンパク因子に依存する過程と、ATPに依存する過程に、分けて行わせた場合は、上清中にラリアット型イントロンが観察されない（レーン5）。そこで、この反応の後、S100フラクションをDEAE-celluloseのカラムクロマトグラフィーで分画した3つのフラクション（図4A参照）を、ATPと共に加えて、アガロースビーズ上の複合体に結合しているラリアット型イントロンが、解離するかどうか調べた。すると、DIIフラクションを加えたときだけ、ラリアット型イントロンが、上清中に観察された（図10レーン9）。このことは、DIIフラクション中の因子が、mRNAとラリアット型イントロンを解離させるために必要であることを示している。筆者はこの因子を、スプライシング産物解離因子（spliced products releasing factor、SRF）と名付けた。また、DIIフラクションとのインキュベーションを、ATPを加えずに行うと、ラリアット型イントロンの解離が起らなかった（レーン13）。この事は、スプライスされたmRNAとラリアット型イントロンの解離には、SRFとATPが必要であることを示している。

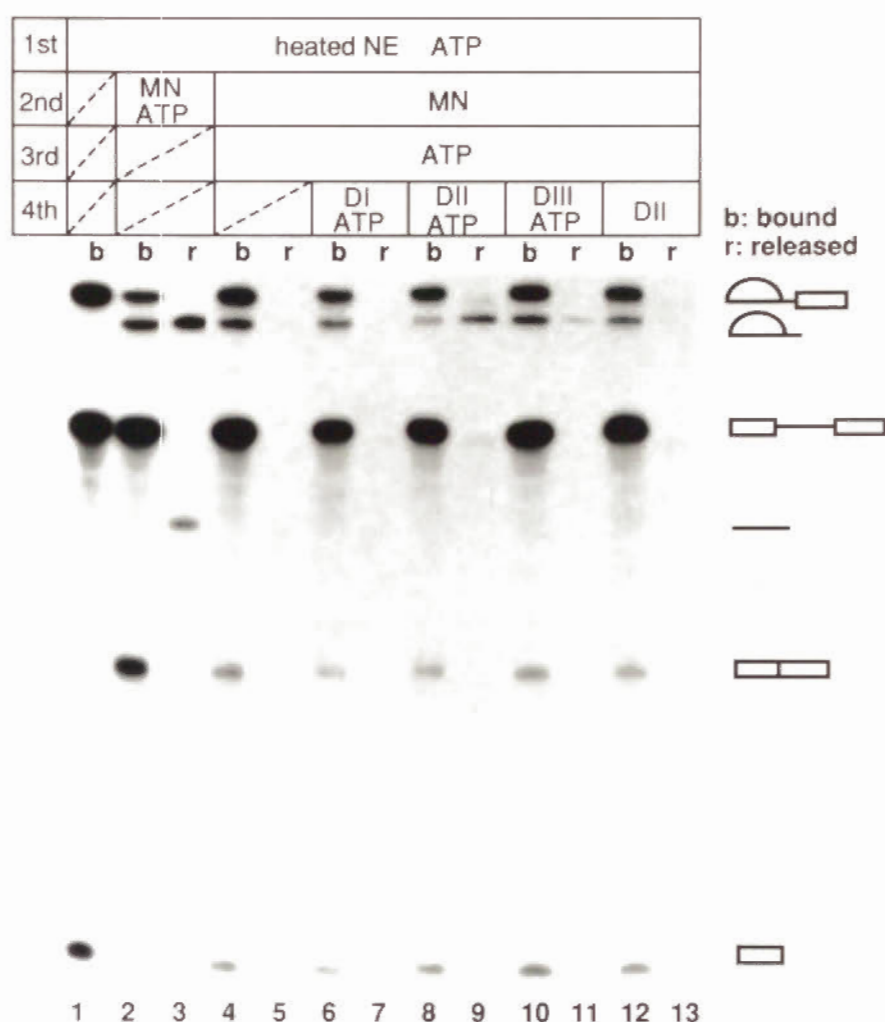


図10. スプライスされたmRNAとラリアット型中間体との解離に必要な因子

固定化したmRNA前駆体を、最初に熱処理した核抽出液と90分間インキュベートした。2回目のインキュベーションは、MNaseで処理した核抽出液とATP存在下（レーン2、3）または非存在下（レーン4-13）で行った。3回目のインキュベーションは1mM ATPを含むバッファーEと60分間、4回目のインキュベーションはDI（レーン6、7）、DII（レーン8、9）DIII（レーン10、11）フラクション（図4A参照）とATP存在下で、またはDIIフラクションとATP非存在下で（レーン12、13）30分間行なった。インキュベーション後、RNAをアガロースビーズから（レーン上にbで示す）、またはアガロースビーズを洗った時の最初の上清から（rで示す）回収し、電気泳動した。図の左に模式的に示したRNA産物のうち直線は、除去され、直鎖化されたイントロンを表す。

第二部

U6snRNAとmRNA前駆体とのアソシエーション

a) 研究の背景

序論で述べたように、スプライシング反応は、U6snRNAによって触媒されるという仮説が提唱されているが (BrowとGuthrie 1989)、これをはっきりと裏付ける実験事実は未だ得られていない。もし、この仮説が正しければ、U6snRNAはスプライシング反応過程で、RNA鎖の切断再結合反応が起こる部位に近接し、この部位と直接相互作用するはずである。筆者は、このようなmRNA前駆体とsnRNAとの相互作用をUV照射によるクロスリンク実験によって検出することを試みた。

b) snRNAのmRNA前駆体とのアソシエーション

mRNA前駆体 (δ EX14-15) をHeLa細胞の核抽出液とインキュベートした後、反応液をバッファーで薄めて、UV照射する。その後、反応液中のタンパク質をタンパク質分解酵素で分解し、核酸だけを回収して、電気泳動によって解析した (図11)。mRNA前駆体およびスプライシング反応の中間体と産物以外に、移動度の遅いバンドがUV照射に依存して、いくつか観察された (図11 レーン2、9、16)。これらのバンドは、mRNA前駆体とアソシエートしていた核抽出液中の核酸とmRNA前駆体が、UV照射によってクロスリンクした産物を反映していると考えられる。スプライシング反応に必要な5種類のsnRNAとmRNA前駆体とのクロスリンク産物が観察されているかどうか調べるために、UV照射後、回収したRNAを、各snRNAに相補的な合成DNAの存在下でRNaseHとインキュベートしてから電気泳動した。合成DNAに相補的なsnRNAとmRNA前駆体とのクロスリンク産物が存在すれば、この処理によって切断され、この産物のバンドは、元の位置には観察されなくなると予想される。

核抽出液と5分間インキュベートした場合には (レーン2-7)、主に4種類の移動度の遅いクロスリンク産物が観察されたが、一番移動度の遅い産物は、U2snRNAに対する合成DNAを用いるとほとんど観察されなくなっ

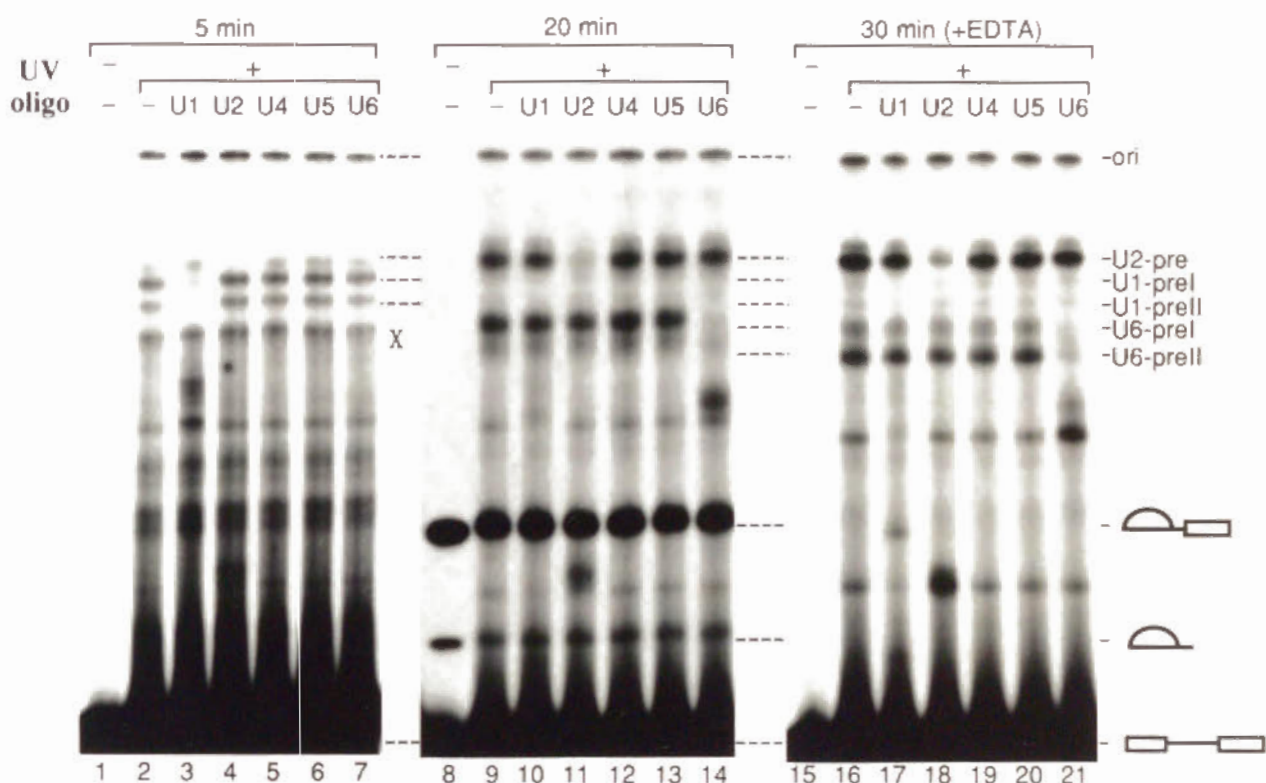


図1 1. snRNAとmRNA前駆体とのクロスリンク産物の同定

mRNA前駆体を核抽出液と5分間（レーン1－7）、20分間（レーン8－14）、または2.5mM EDTAの存在下で30分間（レーン15－21）インキュベートした後、（材料と方法）に示したようにUV照射し、RNAを回収した。回収したRNAを、各レーンの上を示したsnRNAに相補的な合成DNA（oligo）の存在下あるいは非存在下でRNaseHで処理し、電気泳動によって解析した。oriは電気泳動のウェルの位置を示す。レーン1、8、15の試料はUV照射していない。各合成DNAは、U1snRNA（64-75nt）、U2snRNA（28-42nt）、U4snRNA（1-15nt）、U5snRNA（78-95nt）、U6snRNA（78-95nt、図15のU6a）に相補的である。各クロスリンク産物の名前を、模式的に表したラリアット型中間体、ラリアット型イントロン、mRNA前駆体とともに図の右に示した。

た。このことから、この産物は、U2snRNAとmRNA前駆体がクロスリンクした産物（U2-preと呼ぶ）だと考えられる。同様の理由から、U2-preのバンドの下に観察された2本のバンドは、どちらもU1snRNAがmRNA前駆体にクロスリンクした産物（U1-preI、U1-preIIと呼ぶ）を反映していることがわかった。これらの産物の下に観察されたバンド（X RNAと呼ぶ）は、どの合成DNAを加えても変化せず、これがどのような産物なのか明らかにできなかった。核抽出液と20分間インキュベートした場合には（図1 1 レーン9 - 14）、U2-preと共に、X RNAと移動度が似たクロスリンク産物が観察された。この産物はU6snRNAに相補的な合成DNAによってほとんど消失し、U6snRNAとmRNA前駆体とのクロスリンク産物（U6-preIと呼ぶ）であることがわかった。核抽出液とEDTA存在下でインキュベートした場合には（レーン16 - 21）、U6-preIより移動度が速い新たなU6snRNAのクロスリンク産物（U6-preII）が観察された。EDTA存在下では、先にも述べたように、スプライスソームは形成されるが、第一段階の反応は起こらない（Abmayrら 1988）。U6-preIIと同様の産物は、核抽出液と20分間インキュベートした場合にもわずかに観察された。

いずれの条件でも、上記の産物以外にいくつかのバンドが観察されたが、これらについては、これ以上解析していない。また、この実験では、同時に2種類以上のsnRNAがmRNA前駆体にクロスリンクした産物は検出できなかった。これは、筆者の用いた条件では、クロスリンクが起こる効率が非常に低いためだと考えられる。この実験では、mRNA前駆体として δ EX14-15を用いたが、別の δ クリスタリン遺伝子由来のmRNA前駆体（ δ EX13-14、Ohnoら 1987）を用いた場合にもU6snRNAのクロスリンク産物が検出された（データは示さず）。 β グロビン遺伝子由来のmRNA前駆体（H β A6、Krainerら 1984）を用いた場合には、U1-preI、U1-preII、U2-preと同様のクロスリンク産物がわずかに検出されたが、U6snRNAのクロスリンク産物は検出されなかった。この理由は、はっきりしないが、 β グロビン遺伝子由来のmRNA前駆体は、 δ クリスタリン遺伝子由来のmRNA前駆体に比べて、スプライシング反応効率が低い（データは示さず）ことと関連しているのかもしれない。

これらのクロスリンク産物と、スプライシング反応との関係を明らかにするためにmRNA前駆体をいろいろな条件でインキュベートしてからUV照射し、解析した（図1 2）。U1-preIとU1-preIIは、mRNA前駆体と核抽出

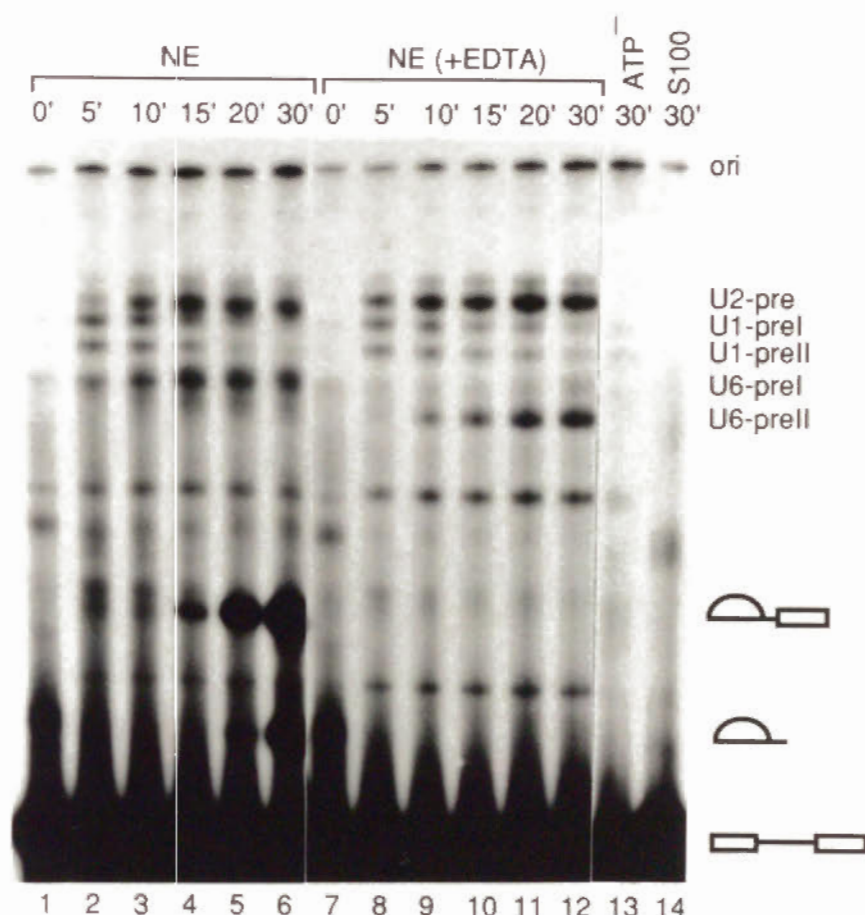


図12. クロスリンク産物が観察される条件

mRNA前駆体を核抽出液 (NE、レーン1-6は細胞質S100フラクション) と、標準条件 (レーン1-6、14)、2.5mM EDTAの存在下 (レーン7-12)、あるいはATPの非存在下 (レーン13) で、各レーンの上にした時間インキュベートし、UV照射後、RNAを回収し、電気泳動した。

液を混合すると同時に（レーン1、7）、またATPを加えなくても（レーン13）、観察された。これは、U1snRNPの5' スプライス部位への結合はインキュベーションやATPに依存しないという過去の報告と一致する（Blackら 1985、BindereifとGreen 1987）。これらのクロスリンク産物は、核抽出液と5分間インキュベートすると非常に顕著に観察されるようになり、さらにインキュベートすると徐々に消失した。このことは、U1snRNAの5' スプライス部位との安定なアソシエーションには、ATPとインキュベーションが必要であること、およびこのアソシエーションが過去に報告されたように（KonarskaとSharp 1986、GrabowskiとSharp 1986）、スプライスソームの形成にともなって不安定になることを示唆している。U2-pre、U6-preI、U6-preIIはATPとインキュベーションに依存して観察された。また、スプライシング反応に必要な全てのsnRNPを持っているが、それ自身ではスプライシング活性がない（KrainerとManiatis 1985）細胞質S100フラクションを用いるとこれらのクロスリンク産物は観察されなかった。これらの結果は、UVクロスリンク法で観察された、U2snRNAとU6snRNAのmRNA前駆体とのアソシエーションがスプライシング反応に依存して起きていることを示している。

c) スプライスソーム内でのU6snRNAのmRNA前駆体とのアソシエーション

UVクロスリンク法で観察されたsnRNAのmRNA前駆体とのアソシエーションがどのような複合体中で起こっているかを解析するために、反応複合体をグリセロールの密度勾配遠心法で分画してから、UVクロスリンク実験を行った（図13）。核抽出液と20分間インキュベートした後、反応液を分画し、偶数フラクションをUV照射して解析した。反応液を分画すると、図3の実験でも触れたように、3つのピークが観察された。このうち、フラクション6に観察される65Sのピークは、このフラクション中に反応中間体が多く含まれていることからわかるように、スプライスソームを反映している。また、フラクション12のピークは、45Sのプレスプライスソームを、フラクション19のピークは、20Sの非特異的な複合体を、それぞれ反映している。

分画した偶数フラクションをUV照射して解析すると、U2-preはスプライ

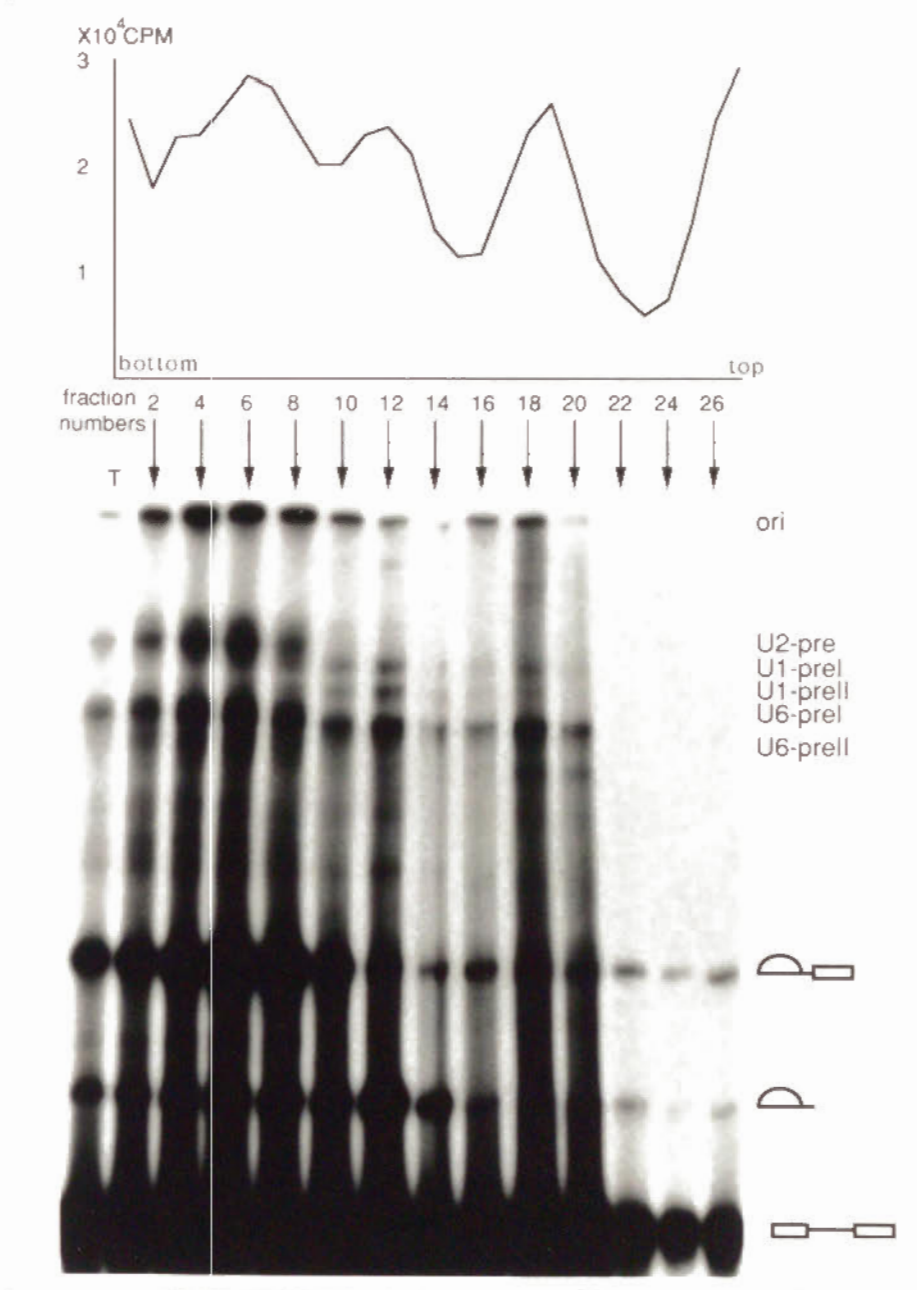


図13. 分画したスプライシング反応の複合体を用いたUVクロスリンク実験

mRNA前駆体を核抽出液と20分間インキュベートした後、グリセロールの密度勾配遠心法で反応液を分画し、各フラクションの放射活性を測定した。各偶数フラクションをバッファーで薄めずにUV照射し、RNAを回収後、電気泳動した。レーンTでは反応液を分画せずにUVクロスリンク実験を行った。

スソームを含むフラクションでのみ観察された。これは、U2snRNPがプレスプライスソーム中に存在するという過去の報告 (KonarskaとSharp 1986) を考えると非常に興味深い。この結果は、U2snRNPがプレスプライスソームに取り込まれた後、スプライスソームが形成されて初めて、mRNA前駆体に直接アソシエートするようになることを示していると思われる。U1-preI、U1-preIIはどちらもプレスプライスソームと非特異的な複合体を含むフラクションで観察されたが、スプライスソームを含むフラクションでは観察されなかった。この結果は、U1snRNPのスプライスソームへの結合が弱いという過去の報告 (KonarskaとSharp 1986、GrabowskiとSharp 1986) と一致している。また、U6snRNPがスプライスソームにのみ観察されるという過去の報告と一致して (KonarskaとSharp 1987、BindereifとGreen 1987)、U6-preIIはスプライスソームを含むフラクションでのみ観察された。スプライスソームを含まないと考えられるフラクション10-20でもU6-preIに似たクロスリンク産物が観察されたが、この産物は、U6-preIより移動度が少し速く、先に述べたXRNAだと考えられる。

核抽出液と5分間インキュベートしてから分画した場合にも、これらのクロスリンク産物は、同様の複合体で観察された (データは示さず)。また、核抽出液とEDTA存在下でインキュベートした場合、U6-preIIは、U6-preIと同様に、スプライスソームを含むフラクションでのみ観察された (データは示さず)。

d) クロスリンク部位の解析

クロスリンクが起こった部位 (クロスリンク部位) を明らかにするため、各クロスリンク産物を電気泳動によって精製し、mRNA前駆体やsnRNAに相補的な合成DNAおよびRNaseHとインキュベート後、切断されたRNAを解析した。なお、この解析に様々な合成DNAを用いたが、おそらくUV照射によってRNAが損傷を受けているため、用いた合成DNAによっては、クロスリンク産物を切断することができなかった。

まず、mRNA前駆体上のクロスリンク部位を解析するため、各クロスリンク産物をmRNA前駆体に相補的な合成DNA (図14b) を用いて、RNaseHで切断した。切断されたRNAを、同じ合成DNAを用いたmRNA前駆体の切断産物をマーカーとして、共に電気泳動して解析した。この実験か

ら得られる結果と、クロスリンク部位との関係を模式的に図1 4 aに示した。クロスリンク部位が、合成DNAに相補的な領域の上流に位置しているなら、mRNA前駆体を同じ合成DNAで処理した時に産生される二つのRNA断片のうち、3'側の断片に対応する断片(3'側mRNA前駆体断片)が、クロスリンク産物からも産生される。そして、5'側の断片に対応するRNA(5'側mRNA前駆体断片)は、snRNAとクロスリンクしているため、mRNA前駆体由来の断片より移動度が遅くなる。逆に、クロスリンク部位が、合成DNAに相補的な領域の下流に位置しているなら、5'側mRNA前駆体断片が、クロスリンク産物から産生される。

図1 4 cに示すように、U1-preIとU1-preIIを5'E合成DNAを用いて切断すると、短い5'側mRNA前駆体断片が観察され、これらのRNAのクロスリンク部位が5'E合成DNAに相補的な領域の下流に位置していることがわかった。これに対して、5'SII合成DNAを用いると、3'側mRNA前駆体断片が産生された。従って、U1-preIとU1-preIIのクロスリンク部位は、共に5'E合成DNAと5'SII合成DNAに相補的な領域の間に位置していることが明らかになった。この実験では、U1-preIとU1-preIIの違いは明らかにできなかったが、mRNA前駆体のこの領域内で違いがあるか、snRNA上のクロスリンク部位が異なっているためだと考えられる。同様にして、U2-preのクロスリンク部位は、BP合成DNAと3'S合成DNAに相補的な領域の間に位置していることがわかった(図1 4 d)。これらの結果は、U1snRNAとU2snRNAが、それぞれ5'スプライス部位とブランチ部位に塩基対合を作って結合するという過去の報告(ZhuangとWeiner 1986、ZhuangとWeiner 1989)を裏付けている。

U6-preIとU6-preIIのクロスリンク部位を解析するために、これらのRNAを、5'SI、5'SII、Int合成DNAを用いて、RNaseHで切断した(図1 4 e)。5'SI合成DNAを用いると、どちらのクロスリンク産物からも、短い5'側mRNA前駆体断片が産生された。同時に、3'側mRNA前駆体断片もわずかに産生されたが、この断片は、合成DNAを加えない場合に観察される、クロスリンクしていないmRNA前駆体に由来していると考えられる。これに対し、Int合成DNAを用いると、3'側mRNA前駆体断片が効率よく産生され、クロスリンク部位が、どちらのRNAの場合も5'SI合成DNAとInt合成DNAに相補的な領域の間に位置していることがわかった。5'SII合成DNAを用いた場合には、U6-preIとU6-preIIで分解産物の泳動パターンに大きな差

図14. mRNA前駆体上のクロスリンク部位の解析

a) この実験の論理を模式的に示した。太い直線は合成DNAを、PAGEは変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を表す。b) δ EX14-15 RNAの5' および3' スプライス部位領域の配列と、実験に用いた合成DNAに相補的な配列を示した。5'SSは5' スプライス部位、BPはブランチ部位、3'SSは3' スプライス部位を表す。c - e) U1-preIとU1-preII (c)、U2-pre (d)、U6-preIとU6-preII (e) のクロスリンク部位の解析。mRNA前駆体を核抽出液と標準条件で5分間 (U1-preIとU1-preII)、20分間 (U2-preとU6-preI)、または2.5mM EDTAの存在下で30分間 (U6-preII) インキュベートし、UV照射した試料から、各クロスリンク産物を2回の電気泳動によって精製した。いずれの標品にも、クロスリンクしていないmRNA前駆体はずかに含まれている。精製したクロスリンク産物とmRNA前駆体を各レーンの上に示した合成DNAの存在下でRNaseHで処理し、電気泳動した。

異が見られた。U6-preIの場合には、移動度の遅いクロスリンクしたRNAと短い5'側mRNA前駆体断片が産生され、クロスリンク部位が5'SI合成DNAと5'SII合成DNAに相補的な領域の間に位置していることがわかった。U6-preIIの場合には、3'側mRNA前駆体断片が効率よく産生され、クロスリンク部位が、5'SII合成DNAに相補的な領域の上流に位置していることがわかった。また、この時、同時に5'側mRNA前駆体断片もはっきりと観察された。このことから、U6-preIIのクロスリンク部位が5'SII合成DNAに相補的な領域内に位置し、この合成DNAの存在下でクロスリンク部位の両側が同時に切断されたことが示唆された。いずれにしても、U6-preIIのクロスリンク部位は5'SI合成DNAと5'SII合成DNAに相補的な領域の間に位置していると結論できる。また、以上のクロスリンク部位の解析の結果、いずれのクロスリンク産物の場合も、そのクロスリンク部位の上流、下流のどちら側で切断しても、直鎖状のmRNA前駆体断片が産生され、これらのクロスリンク産物が、スプライス部位反応の中間体や産物でなく、反応を受けていないmRNA前駆体とsnRNAのクロスリンク産物であることが明確に証明された。

次に、U6snRNA上のクロスリンク部位を明らかにするため、U6-preIとU6-preIIを、U6snRNAに相補的な4種類の合成DNA (図15a)を用いて、RNaseHで切断した。U6snRNAは標識されていないので、mRNA前駆体がクロスリンクした分解産物のみが観察される。図15bに示すように、U6-preIとU6-preIIどちらの場合にも、U6aからU6cへと、用いる合成DNAに相補的な領域を徐々に上流側にすると、分解産物の移動度は、それにつれて、大きくなった。この結果は、クロスリンク部位が、U6c合成DNAに相補的な領域の上流に位置していることを示している。U6-preIIをU6d合成DNAを用いて切断すると、U6c合成DNAを用いた場合と比べて、非常に移動度の遅い分解産物が観察された。このことは、U6-preIIのクロスリンク部位が、U6c合成DNAとU6d合成DNAに相補的な領域の間に位置していることを示している。この領域は、過去に報告されたU6snRNAの機能にとって不可欠な配列を含んでいる (Bindereifら 1990、Vankanら 1990、FabrizioとAbelson 1990)。U6-preIの場合は、U6d合成DNAを用いると切断されなかったため、クロスリンク部位が、U6c合成DNAに相補的な領域の上流に位置すること以上には明らかにできなかった。

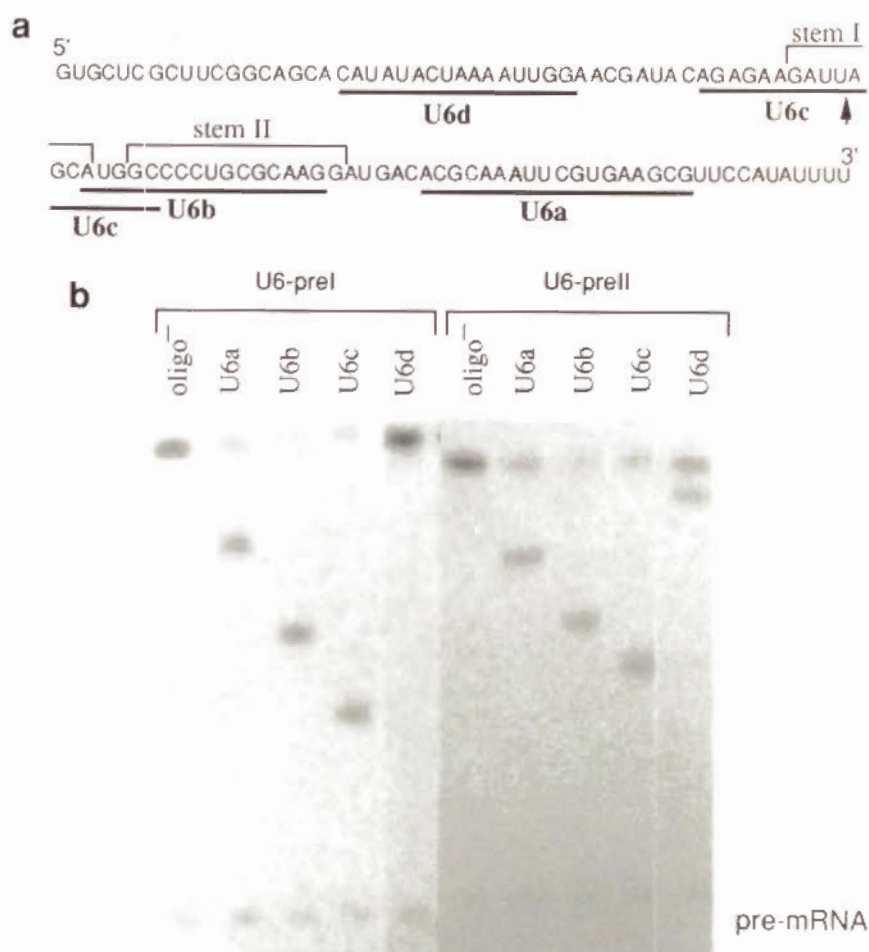


図15. U6snRNA上のクロスリンク部位の解析

a) ヒトのU6snRNAの全塩基配列と、実験に用いた合成DNAに相補的な配列を示した。stemIとstemIIはU4snRNAと塩基対合を形成する2つの領域 (Bindereifら 1990) を、矢印は*S.pombe*のU6snRNA中のイントロンが挿入されている部位 (TaniとOhshima 1989) に対応する部位を示す。b) U6-preIとU6-preIIのクロスリンク部位の解析。図14と同様にして精製したクロスリンク産物を、各レーンの上を示した合成DNAの存在下でRNaseHで処理し、電気泳動した。

第四章 考察

a) 固定化したmRNA前駆体を用いた実験系

mRNA前駆体を固定化する実験系は、先に、RubyとAbelson (1988) によって開発された。彼らは、mRNA前駆体の3'末端の配列に相補的な、ビオチン化した短いRNAを*in vitro*で合成し、このRNAを介して、mRNA前駆体をアガロースビーズ上に固定化した。彼らは、この方法を用いて、酵母の*in vitro*スプライシング系で、反応初期のU1snRNPの役割について解析した。しかし、彼らの実験では、酵母の抽出液とのインキュベーションの際に、かなりの量のmRNA前駆体が、非特異的にアガロースビーズから解離してしまっている。筆者も、同様の方法で、HeLa細胞の系で試みてもみたが、mRNA前駆体の解離のため、筆者の目的とする反応後期の解析には適さないことがわかった（データは示さず）。この原因は、いくつかの生物種で観察されているRNAの二本鎖をunwindさせる活性（BassとWeintraub 1988）によると考えられる。

筆者が新たに開発した、mRNA前駆体を固定化する実験系では、mRNA前駆体自身をビオチン化しているので、核抽出液とインキュベートしても、mRNA前駆体は解離せず安定に固定化されている。また、RubyとAbelson (1988) が用いた方法では、スプライシング反応効率が、固定化していないmRNA前駆体を用いた場合に比べて、非常に低かったのに対し、筆者の方法では、反応効率はほとんど変わらなかった。この原因が、酵母の系とHeLaの系の違いに起因するのか、固定化する方法の相違に起因するのか明らかではない。いずれにせよ、筆者の用いた方法は、スプライシング反応後期過程を解析する上で、非常に有効であると結論できる。

b) 第二段階の反応に関与する因子

筆者は第二段階の反応に必要な因子、HLFとDEAE-Iが、ATPに依存せずに、スプライソソームに作用することを明らかにした。HLFは熱に弱い因子であり、過去に同定され、第二段階の反応にのみ必要なことが報告されている（KrainerとManiatis 1985）。この因子の活性は、モノQクロマトグラフィーで、単一の分画に観察されることから（データは示さず）、お

そらく単一の因子によると考えられる。DEAE-Iは、今のところ全くの粗精製標品に過ぎず、第二段階のみに必要であるかどうか不明である。しかし、DEAE-I活性を持つフラクションとはほぼ同様に分画されたフラクション (Ia) 中の因子が第二段階の反応にのみ必要であることが報告されているので (Perkinsら 1986)、この因子も第二段階だけに必要なのかもしれない。

DEAE-IIIは、おそらく第一段階の反応前からスプライスソーム内に存在し、第二段階の反応に必要な因子である。この因子はDEAE-celluloseカラムから高塩濃度で溶出されるが、このフラクションには核酸が多く含まれ、snRNPも多く含まれると考えられるので、この因子とsnRNPとの関連が注目される。このことを、調べる方法としては、このフラクション中のRNA成分をMNaseで壊してから活性を検定することが考えられる。しかし、理由は不明だが、この因子は、MNaseの酵素活性に必要なカルシウムに感受性であるため (データは示さず)、この方法で調べるができなかった。ただし、この因子が解離したスプライスソームからの第二段階の反応は、MNaseで処理した核抽出液とATPを加えれば起こるので (データは示さず)、少なくとも核抽出液の内ではMNaseに耐性の因子である可能性が強い。また、この因子は、密度勾配遠心法でスプライスソームを分画するとスプライスソームから解離してしまうことから、スプライスソームへの結合が弱いと考えられるが、U1snRNPも同様にスプライスソームへの結合が弱いことが指摘されており (KonarskaとSharp 1986、GrabowskiとSharp 1986)、これらの因子の関心に興味を持たれ、今後の研究課題の一つである。

今後、これらの因子の機能を明らかにするためには、これらの因子をさらに精製する必要があるが、HeLa細胞の核抽出液やS100フラクションから、homogeneityになるまで精製することは非常に困難である。一方、酵母では、温度感受性突然変異株の研究から、第二段階の反応に必要な因子の遺伝子がクローニングされており (VijayraghavanとAbelson 1990、Burgessら 1990、Companyら 1990)、これらの遺伝子や、その産物に対する抗体を用いて、HeLa細胞の系で、スプライシング因子の機能を解析できれば、非常に有効な手段になるであろう。

c) スプライシング経路と3種類のスプライスソーム

筆者は、スプライシング反応が、3種類のスプライスソーム、I、IIa、IIbを経て起こることを明らかにした（図16）。スプライスソームIはmRNA前駆体を含むスプライスソームの総称である。このスプライスソームの3' スプライス部位領域はRNaseHに対して耐性であり、この部位にスプライスソームの構成因子が結合していると考えられる。おそらく、この構成因子は、過去に報告されたmRNA前駆体の3' スプライス部位に結合する因子のうちのどれかであろう。今までに、IBP（GerkeとSteitz 1986、Taziら 1986）、3種類のhnRNPタンパク質（SwansonとDreyfuss 1988）、U2AF（Ruskinら 1988）、p62（Garcia-Blancoら 1989）が、この部位に結合することが報告されている。

スプライスソームIIaは、熱処理した核抽出液で形成される反応中間体を持ったスプライスソームである。このスプライスソームは、密度勾配遠心法で65Sの複合体として観察される。また、Reedらはこのスプライスソームをゲル濾過クロマトグラフィーで分画し、電子顕微鏡写真を撮った（Reedら 1988）。筆者の研究でスプライスソームIIaの3' スプライス部位領域はRNaseHに対して感受性であり、スプライスソームの構成因子が結合せず、露出していることが示された。通常のスプライシング反応においても、スプライスソームIIaの場合のように、RNaseHに対して感受性のラリアット型中間体が第二段階の反応初期に観察され、通常のスプライシング過程でも、スプライスソームIIaが形成されることが示唆された。

スプライスソームIIbは、タンパク因子HLFとDEAE-Iの作用によってスプライスソームIIaから形成される。このスプライスソームからの第二段階の反応は、核抽出液等を加えなくても、ATPを加えただけで起るので、スプライスソームIIbは、第二段階の反応に必要なATP以外の全ての因子を持っていると考えられる。スプライスソームIIbの3' スプライス部位領域は、RNaseHに対して耐性であり、スプライスソームの構成因子がこの部位に結合していると考えられる。同様にRNaseHに対して耐性のラリアット型中間体が、熱処理していない核抽出液を用いた場合も、第二段階の反応後期に観察された。このことは、通常のスプライシング反応においても、スプライスソームIIbを経て、反応が起こることを示唆している。

d) スプライスソームのコンフォメーションの変化

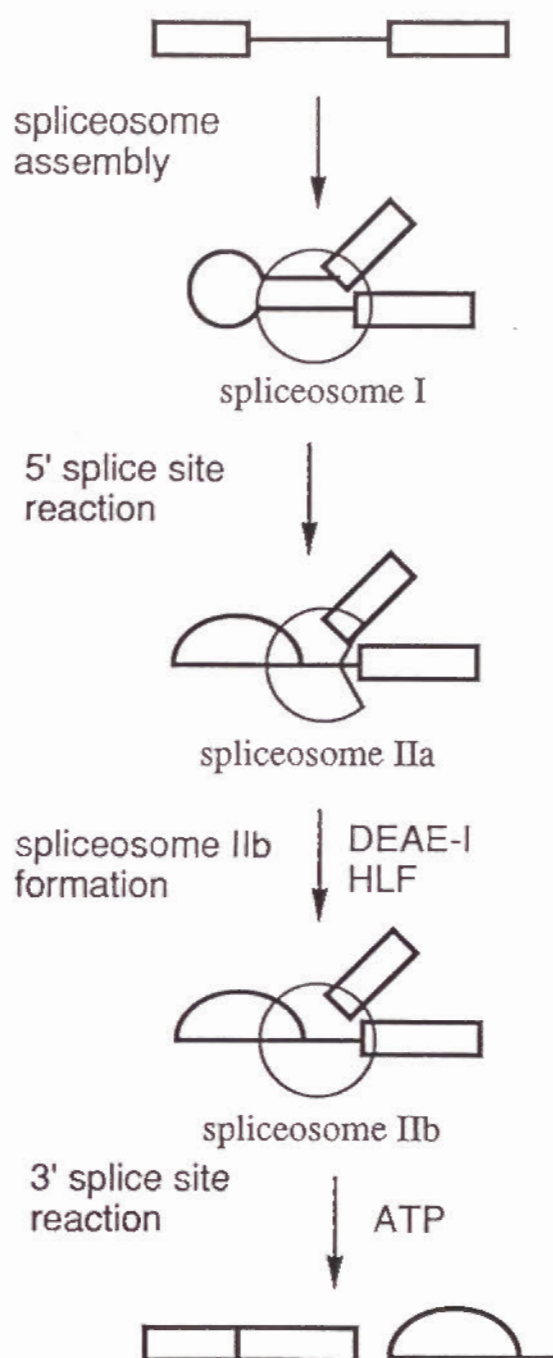


図16. スプライスソームのコンフォメーションの変化

第一部の実験結果から考えられるスプライスソーム形成後のスプライシング反応過程のモデルを模式的に表した。

以上に述べたように、3' スプライス部位領域のRNaseHに対する感受性は、スプライシング反応過程で大きく変化している（図16）。スプライスソームIは、RNaseHに対して耐性だが、スプライスソームIIaでは、感受性になっている。そして、スプライスソームIIbでは、再び耐性になっている。これは、おそらくスプライスソームのコンフォメーションの変化を反映していると考えられる。スプライスソームIとIIb内で、どのような因子が3' スプライス部位に結合しているか明らかでないが、スプライスソームIIa内では因子が結合していないことを考えると、スプライスソームIとIIbで異なる因子が結合している可能性が強い。Reedは（1989）、第一段階と第二段階の反応に必要な、3' スプライス部位領域の配列が異なっていることから、同様の可能性を指摘している。

スプライスソームIとIIbで結合している因子について考察する上で、第一段階と第二段階での3' スプライス部位の役割を考えることは重要である。第一段階では、この部位の認識が起こると考えられる。実際、この領域に結合することが報告されている先に述べた諸因子の結合には、この領域内のピリミジンクラスター（ピリミジンが連続する配列）や、3' スプライス部位のAG配列が必要である。従って、スプライスソームI内でも、これらの因子が結合していることが考えられる。これに対し、第二段階では、この部位で、RNA鎖の切断再結合反応が起こる。従って、少なくとも第二段階の最後には、反応を触媒する因子がこの部位に近接して存在するはずである。スプライスソームIIbは、反応が起こるために、まだATPを必要とするので、そのような最終段階のスプライスソームだとは考えられないが、このスプライスソーム内ですでに、反応を触媒する因子が結合している可能性はある。一方、最近、ピリミジンクラスターが長い場合には、第一段階の反応に3' スプライス部位のAG配列が必要でないことが報告され（Smithら 1989、Reed 1989）、3' スプライス部位の認識が、第一段階での認識とは独立に、第二段階でも起こることが示唆された。この点から考えると、スプライスソームIIb内でも、この部位を認識する第一段階の場合とは別の因子が結合しているのかも知れない。また、スプライスソームIIbの形成にはATPが必要ないので、スプライスソーム内で大きな構造変化が起こって3' スプライス部位領域がRNaseHに対して保護されるようになると考えるよりは、スプライスソームIIbの形成に関与するHLFやDEAE-Iが直接この領域に結合すると考えた方が自然に思われる。第二段階

の反応機構を考える上で、スプライスソームIIb内で3' スプライス部位領域に結合している因子を明らかにすることは非常に重要であり、今後の解析が望まれる。

e) 第二段階の反応に必要なATPの役割

筆者は、第二段階の反応にATPが必要であること、また、ATPは、反応に必要な全てのタンパク因子を持った複合体、スプライスソームIIb、が形成されてから要求されることを明らかにした。第二段階の反応に必要なATPの具体的な役割については明らかにできなかったが、考えられる幾つかの可能性について考察してみる。

まず、RNA鎖の切断再結合反応に必要なエネルギー源としてATPが要求されるという可能性が考えられる。しかし、序論で述べたようにmRNAスプライシング反応は、グループIイントロンやグループIIイントロンの場合と同様に、RNAが触媒するATP等のエネルギーを必要としないエステル交換反応によって起こるという考えが提唱されている(Sharp 1985、Cech 1986)。従って、この可能性は薄いように思われる。またATPは、反応に必要な全てのタンパク因子が集合した後に必要になるので、タンパク因子のスプライスソームへの結合に必要だという可能性は否定できる。

先ほども述べたように、第二段階の反応では、反応を触媒する因子が3' スプライス部位に近接する必要がある。もし、触媒する因子が第一段階と第二段階とで同一であれば、この因子は、第一段階では、ブランチ部位に近接しており、第二段階では3' スプライス部位に移動しなければならない。従って、ATPのエネルギーがこの移動のために必要である可能性が考えられる。また、これと関連するが、ATPがスプライスソームを構成するsnRNAや基質RNA間の相互作用を変化させるため、具体的にはRNAヘリカーゼ様の活性に必要であることも考えられる。

f) SRFの役割

筆者は、スプライシング反応が終わった後、スプライスされたmRNAとラリアット型イントロンは自然に解離するのではなく、タンパク因子SRFとATPの作用で解離することを明らかにした。スプライスされたmRNAは、

反応複合体から離れて、核外へ輸送され、タンパク質に翻訳される。SRFはおそらく、スプライシング反応の後、mRNAが機能するために必須な因子であると考えられる。また、snRNP等のスプライシング因子が再利用されるためにも必要な因子であろう。

酵母の温度感受性突然変異株の研究から、SRFと同様の活性を持つと考えられる因子 (*PRP22*) が報告されている (Companyら 1989)。この因子の温度感受性突然変異株では、非許容温度で、mRNA前駆体とラリアット型イントロンが蓄積し、酵母の生育に、必須の因子だと考えられる。この因子の遺伝子は、最近クローニングされ、この因子がRNA結合部位と、RNAヘリカーゼ等にみられるATP結合部位を持っていることが報告されている (Companyら 1990)。おそらく、*PRP22*やSRFは、snRNA、mRNA、ラリアット型イントロンの間の塩基対合などの相互作用をATPのエネルギーを使って壊し、これらのRNAを解離させるのであろう。

g) U1snRNAとU2snRNAのmRNA前駆体とのアソシエーション

UVクロスリンク法は、過去にRNA分子間あるいは分子内の特異的なアソシエーションを解析するために使われてきた (Branchら 1989)。筆者がこの方法を用いて観察したU1snRNAとU2snRNAのmRNA前駆体とのアソシエーションは、それが起こる条件や、mRNA前駆体上の領域など、多くの点で過去の報告と一致し、この方法によって得られた結果が、mRNAスプライシング反応過程を反映していることを裏付けている。しかしながら、これらのsnRNAのmRNA前駆体とのアソシエーションを直接観察したのはこの研究が初めてであり、今までは、スプライシング反応のどの過程でこのようなアソシエーションが起こるのかははっきりしていなかった。U1snRNAに関しては、今回の研究で、snRNPとして5' スプライス部位に結合したときから、snRNAとこの部位との直接のアソシエーションが起こっていることがわかった。また、このアソシエーションはスプライスソームが形成された後、観察されなくなる。U1snRNPがスプライスソームに存在しているかどうかに関しては、過去に何回か議論されてきたが (KonarskaとSharp 1986、GrabowskiとSharp 1986、BindereifとGreen 1987)、最近の報告によれば (Zillmannら 1988)、U1snRNPはスプライスソーム内に存在しているが、スプライスソームへの結合が弱いと考えられる。

筆者の研究によれば、スプライスソームが形成されると、U1snRNAはmRNA前駆体と塩基対合しなくなり、このように不安定になると考えられる。また、U2snRNAに関しては、プレスプライスソームが形成される過程で、RNPとしてはブランチ部位に結合するが (KonarskaとSharp 1986)、筆者の研究から、U2snRNAが直接この部位と相互作用するのは、スプライスソームが形成された後であることが示唆された。

h) U6snRNAのmRNA前駆体とのアソシエーション

筆者は、U6snRNAがスプライスソーム内で、直接5' スプライス部位領域にアソシエートしていることを見いだした。しかし、U6snRNAがこの領域にアソシエートし、この領域と相互作用することが、スプライシング反応に必要なのかどうか分からない。特に、U6-preIとして観察されたアソシエーションに関しては、U6snRNAのアソシエートしている部位は、5' スプライス部位の下流の保存されていない領域であり、この部位との相互作用がスプライシング反応に不可欠だとは考えにくい。これに対し、U6-preIIとして観察されたアソシエーションの場合、アソシエートしている部位は、5' スプライス部位自身か、少なくともこれに非常に近い部位であり、U6snRNAがこの部位近くにアソシエートしていることの意味が非常に興味深い。この領域とのアソシエーションは、EDTA存在下で第一段階の反応を阻害した時に顕著に観察されたが、通常のスプライシング反応条件では微かにしか観察されなかった。おそらく、このアソシエーションは、通常の反応では一過的 (transient) であり、またEDTAは、スプライシング反応過程で、U6snRNAがこの領域にアソシエートしている状態から、次の過程への移行を阻害していることが考えられる。さらにU6snRNAがスプライシング反応を触媒するという仮説を考慮すれば、U6snRNAは初め、5' スプライス部位の下流に位置しているが、第一段階の反応の前に、この部位に非常に接近すると考えるのが妥当だと思われる。いずれにしても、プレスプライスソーム内で5' スプライス部位にアソシエートしていたU1snRNAと入れ替わるように、スプライスソーム内では、U6snRNAが5' スプライス部位に近接していることが結論できる。

i) U6snRNAはスプライシング反応を触媒するか?

U6snRNAがスプライシング反応を触媒するという仮説 (BrowとGuthrie 1989) にとって、このsnRNAが単独で何らかの反応を触媒できることを示すことが一番直接的な証明法であるが、今のところそのようなU6snRNAの活性は報告されていない。U6snRNAはスプライスソーム内でしか触媒活性を持っていないことも十分考えられ、このような直接的な証明が成功するとは限らない。これに対し、この仮説が成り立つための必要条件が満たされていることを示すことも非常に重要である。U6snRNAが、触媒反応が起こる一つの部位である5' スプライス部位に近接しているという筆者の観察はこの仮説の一つの必要条件を満たし、この仮説を支持している。

もし、U6snRNAがスプライシング反応を触媒するのであれば、第一段階の反応は5' スプライス部位とブランチ部位との間で起こるので、U6snRNAは5' スプライス部位と共に、ブランチ部位にも近接しなければならない。ところが、スプライスソーム内のブランチ部位には、筆者が示したようにU2snRNAがアソシエートしている。このことから次に挙げるいくつかの可能性が推察される。第一の可能性では、U2snRNAが、第一段階の反応が起こる直前にブランチ部位から離れ、それに替わって、U6snRNAがこの部位に接近する。第二の可能性では、U2snRNAがブランチ部位にあって、U6snRNAを導く。第三の可能性では、U2snRNAはU6snRNAと共同して、第一段階の反応を触媒する。これらの可能性を調べるためにも、第一段階の反応後の、snRNAのスプライスソーム内での位置を知ることは重要である。また、U6snRNAがスプライシング反応を触媒するのなら、このsnRNAは、第二段階の反応の際には、3' スプライス部位に近接しなければならない。このような点で、今回観察できなかった反応中間体とsnRNAとのアソシエーションを解析することは非常に重要であり、今後検討して行きたい。

j) スプライシング反応過程のモデル

第一部、第二部での結果と、過去の報告を総合して、snRNPを中心に、スプライシング反応が起こる過程のモデルを考えた (図17)。

1. U1snRNPが5' スプライス部位に結合する。この時点で、U1snRNAとmRNA前駆体との直接のアソシエーションは弱いながら起こっているが、

次のプレスプライスソームが形成される過程で安定化される。2. U2snRNPがATPに依存して、U2AFなど3' スプライス部位領域に結合する因子を介して結合し、プレスプライスソームが形成される。この時、U2snRNAとmRNA前駆体は直接アソシエートしていない。3. U4、U5、U6snRNPがATPに依存して一つの複合体を作り、プレスプライスソームに結合して、スプライスソームが形成される。この時、U1snRNPは5' スプライス部位から離れ、替わってU6snRNAがこの部位の下流に位置するようになる。4. U4、U6snRNA間の塩基対合が解離する。また、U6snRNAが5' スプライス部位に接近する。5. U2snRNAがブランチ部位から離れ、替わってU6snRNAがこの部位に接近する。また、3' スプライス部位に結合していた因子が解離する。6. U6snRNAが触媒して、第一段階の反応が起こり、スプライスソームIIaが形成される。7. HLFまたはDEAE-Iが3' スプライス部位に結合し、スプライスソームIIbが形成される。8. ATPのエネルギーを使ってU6snRNAがブランチ部位から3' スプライス部位に移動する。また、U5snRNAがブランチ部位に結合する。U5snRNPの結合に関する根拠は次の通りである。イントロンの5' 末端のGU配列が塩基置換されたいくつかのmRNA前駆体では、第一段階の反応は起こるが第二段階の反応は起こらない (ParkerとGuthrie 1985、Newmanら 1985、Aebiら 1986)。NewmanとNormanは (1990)、塩基置換が起こった酵母のU5snRNAが、このような5' スプライス部位の変異を抑制することを報告している。つまり、U5snRNAが第二段階の反応の際、ラリアット構造によってブランチ部位に連結されたイントロンの5' 末端の配列と相互作用することが示唆されている。9. U6snRNAの触媒によって第二段階の反応が起こる。10. SRFとATPの作用で、スプライスされたmRNAとラリアット型イントロンが解離する。この時、スプライスソーム内にあったsnRNPは、ラリアット型イントロンにアソシエートしている。

おそらくこのようなスプライシング反応過程で、snRNA間や、snRNAとmRNA前駆体との間の相互作用が激しく変化すると考えられる。そして、このようなRNA間の相互作用の変化はATPのエネルギーを使ってRNAヘリカーゼによって引き起こされるのであろう。実際、酵母の温度感受性突然変異株の研究からクローニングされたスプライシング因子のいくつかは、RNAヘリカーゼによく見られるATP結合部位を持っている (Dalbadie-McFarlandとAbelson 1990、Burgessら 1990、Companyら 1990

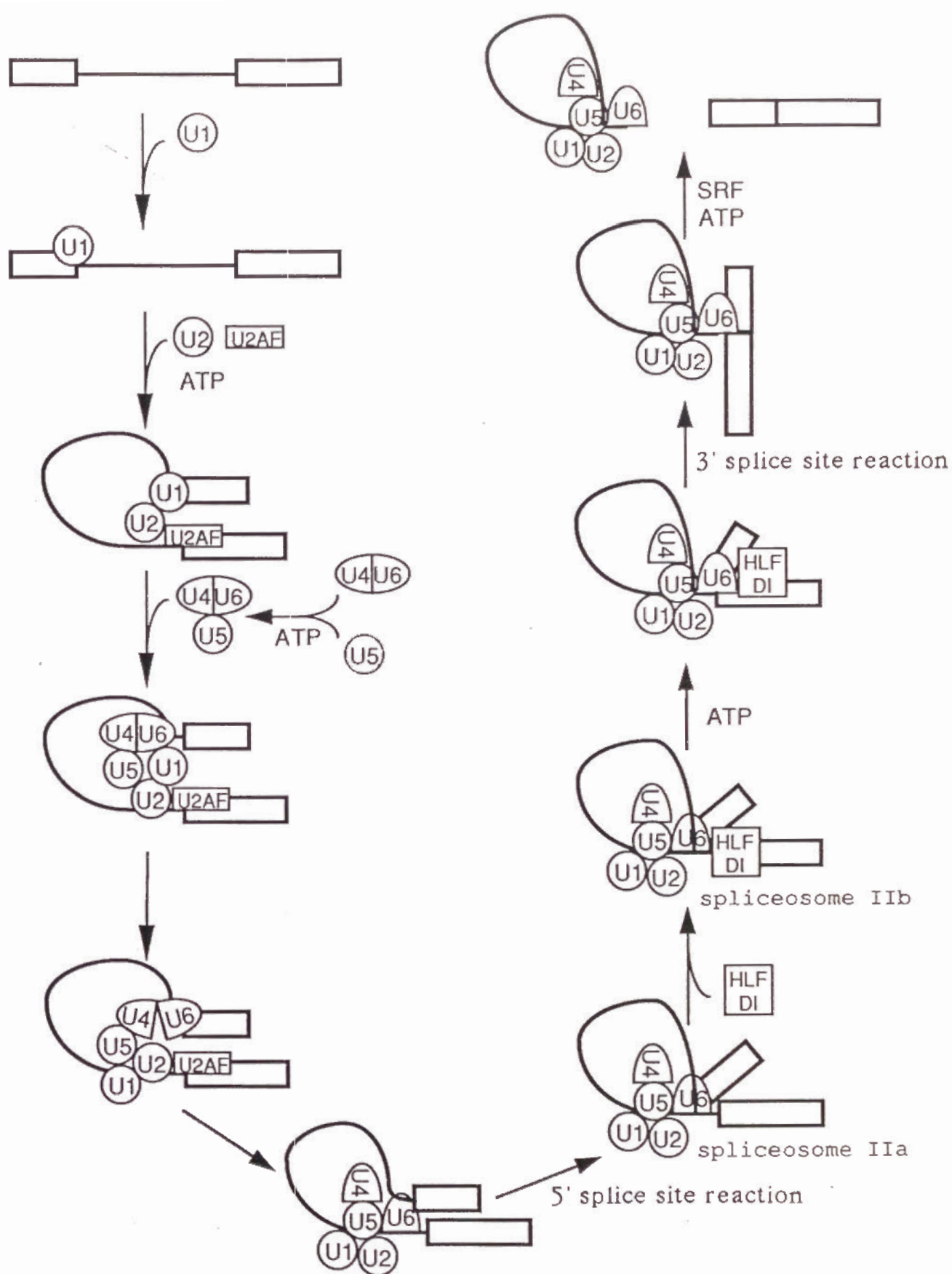


図17. スプライシング反応過程のモデル

この研究の結果と過去の報告を総合して考えたスプライシング反応が起こる過程のモデルを、snRNPを中心に模式的に表した。

)。今後、このようなRNA間の相互作用の研究が、スプライシング因子の研究と共に、スプライシング反応機構の解明に大きく寄与するであろう。

謝辞

私が4回生として研究室に入った頃は、不勉強のためスプライシング反応についての知識はほとんどなく、プロレスの技のような”ラリアット”という言葉をなんとか知っている程度でした。そのような私が、ここまでやってこられたのは、先生、先輩方の辛抱強い指導のおかげです。志村令郎教授には、私の突拍子もない考えを、厳しく批判しながらも、自由に実験することを許していただき感謝しています。私の複雑な実験結果は、志村先生と議論することで初めて、多くの人が納得できる価値のあるデータになりました。坂本博、大野睦人、白石英明博士には、実験手法、手順についての指導、そして何よりも、私の研究心を鼓舞していただき感謝しています。先輩方の真剣な議論を聞いているうちに、私も興味を持って自主的に実験を組み立てて行けるようになりました。安田国雄先生には、RNAプロセッシングという分野の外から、貴重な助言をいただき感謝しています。そして、どんなに些細な、または意味不明の実験結果に対しても、活発な議論が自然に行われる、自由で明るい研究室に在籍したことを好運に思います。また、後輩諸君には、我儘な私に腹をたてずに、オリゴヌクレオチドの合成や、核抽出液の調製などいろいろとお世話になり、ありがとうございました。

引用文献

- Abmayr, S.M., R. Reed, and T. Maniatis. 1988. Identification of a functional mammalian spliceosome containing unspliced pre-mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 7216-7220.
- Aebi, M., H. Horning, R.A. Padgett, J. Reiser, and C. Weissmann. 1986. Sequence requirements for splicing of higher eukaryotic nuclear pre-mRNA. *Cell*, **47**: 555-565.
- Bass, B.L., and H. Weintraub. 1988. An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate. *Cell*, **55**: 1089-1098.
- Berget, S.M., and B.L. Robberson. 1986. U1, U2, and U4/U6 small nuclear ribonucleoproteins are required for *in vitro* splicing but not polyadenylation. *Cell*, **46**: 691-696.
- Bindereif, A., and M. R. Green. 1987. An ordered pathway of snRNP binding during mammalian pre-mRNA splicing complex assembly. *EMBO J.*, **6**: 2415-2424.
- Bindereif, A., T. Wolff, and M.R. Green. 1990. Discrete domains of human U6 snRNA required for the assembly of U4/U6 snRNP and splicing complexes. *EMBO J.*, **9**: 251-255.
- Black, D.L., and J.A. Steitz. 1986. Pre-mRNA splicing *in vitro* requires intact U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein. *Cell*, **46**: 697-704.
- Black, D.L., B. Chabot, and J.A. Steitz. 1985. U2 as well as U1 small nuclear ribonucleoproteins are involved in premessenger RNA splicing. *Cell*, **42**: 737-750.
- Blencowe, B.J., B.S. Sproat, U. Ryder, S. Barabino, and A.I. Lamond. 1989. Antisense probing of the human U4/U6 snRNP with biotinylated 2'-OMe RNA oligonucleotides. *Cell*, **59**: 531-539.
- Branch, A.D., B.J. Benenfeld, C.P. Paul, and H.D. Robertson. 1989. Analysis of ultraviolet-induced RNA-RNA cross-links: a means for probing RNA structure-function relationships. *Meth.Enzym.*, **180**: 418-442.

- Brody, E., and J. Abelson. 1985. The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science*, **228**: 963-967.
- Brow, D.A., and C. Guthrie. 1989. Splicing a spliceosomal RNA. *Nature*, **337**: 14-15.
- Burgess, S., J.R. Couto, and C. Guthrie. 1990. A putative ATP binding protein influences the fidelity of branchpoint recognition in yeast splicing. *Cell*, **60**: 705-717.
- Cech, T.R. 1986. The generality of self-splicing RNA: relationship to nuclear mRNA splicing. *Cell*, **44**: 207-210.
- Cech, T.R. 1990. Self-splicing of group I introns. *Annu. Rev. Biochem.*, **59**: 543-568.
- Cech, T.R., and B.L. Bass. 1986. Biological catalysis by RNA. *Annu. Rev. Biochem.*, **55**: 599-629.
- Chabot, B., D.L. Black, D.M. LeMaster, and J.A. Steitz. 1985. The 3' splice site of pre-messenger RNA is recognized by a small nuclear ribonucleoprotein. *Science*, **230**: 1344-1349.
- Choi, Y.D., P.J. Grabowski, P.A. Sharp, and G. Dreyfuss. 1986. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins: role in RNA splicing. *Science*, **231**: 1534-1539.
- Company, M., J. Arenas and J. Abelson. 1990. *PRP* genes share sequence homology among themselves and with other proteins. *Abstracts of papers presented at the 1990 meeting on RNA processing*, pp67, Cold spring Harbor Lab.
- Company, M., J. Arenas, U. Vijayraghavan, and J. Abelson. 1989. Characterization of *prp17* and *prp22*, temperature sensitive splicing mutants in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Abstracts of papers presented at the 1989 meeting on RNA processing*, pp155, Cold spring Harbor Lab.
- Couto, J.R., J. Tamm, R. Parker, and C. Guthrie. 1987. A *trans*-acting suppressor restores splicing of a yeast intron with a branch point mutation. *Genes Dev.*, **1**: 445-455.

Dalbadie-McFarland, G., and J. Abelson. 1990. *PRP5*: a helicase-like protein required for mRNA splicing in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 4236-4240.

Dignam, J.D., R.M. Lebovitz, and R.G. Roeder. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.*, **11**: 1475-1489.

Dreyfuss, G. 1986. Structure and function of nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein particles. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **2**: 459-498.

Fabrizio, P., and J. Abelson. 1990. Two domains of yeast U6 small nuclear RNA required for both steps of nuclear precursor messenger RNA splicing. *Science*, **250**: 404-409.

Friendewey, D., and W. Keller. 1985. Stepwise assembly of a pre-mRNA splicing complex requires U-snRNPs and specific intron sequences. *Cell*, **42**: 355-367.

Fu, X.-D., and T. Maniatis. 1990. Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature*, **343**: 437-441.

Furneau, H.M., K.K. Perkins, G.A. Freyer, J. Arenas, and J. Hurwitz. 1985. Isolation and characterization of two fractions from HeLa cells required for mRNA splicing *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 4351-4355.

Garcia-Blanco, M.A., G.J. Anderson, J. Beggs, and P.A. Sharp. 1990. A mammalian protein of 220 kDa binds pre-mRNAs in the spliceosome: A potential homologue of the yeast *PRP8* protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 3082-3086.

Garcia-Blanco, M.A., S.F. Jaminson, and P.A. Sharp. 1989. Identification and purification of a 62,000-dalton protein that binds specifically to the polypyrimidine tract of introns. *Genes Dev.*, **3**: 1874-1886.

Gerke, V., and J.A. Steitz. 1986. A protein associated with small nuclear ribonucleoprotein particles recognizes the 3' splice site of premessenger RNA. *Cell*, **47**: 973-984.

- Grabowski, P.J., and P.A. Sharp. 1986. Affinity chromatography of splicing complexes: U2, U5, and U4+U6 small nuclear ribonucleoprotein particles in the spliceosome. *Science*, **233**: 1294-1299.
- Grabowski, P.J., S.R. Seiler, and P.A. Sharp. 1985. A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. *Cell*, **42**: 345-353.
- Green, M.R. 1986. Pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Genet.*, **20**: 671-708.
- Guthrie, C., and B. Patterson. 1988. Spliceosomal snRNAs. *Annu. Rev. Genet.*, **22**: 387-419.
- Hardy, S.F., P.J. Grabowski, R.A. Padgett, and P.A. Sharp. 1984. Cofactor requirements of splicing of purified messenger RNA precursors. *Nature*, **308**: 375-377.
- Hartwell, L.H. 1967. Macromolecule synthesis in temperature-sensitive mutants of yeast. *J. Bacteriol.*, **93**: 1662-1670.
- Hernandez, N., and W. Keller. 1983. Splicing of *in vitro* synthesized messenger RNA precursors in HeLa cell nuclear extracts. *Cell*, **35**: 89-99.
- Konarska, M.M., and P.A. Sharp. 1986. Electrophoretic separation of complexes in the splicing of precursors to mRNAs. *Cell*, **46**: 845-855.
- Konarska, M.M., and P.A. Sharp. 1987. Interactions between small nuclear ribonucleoprotein particles in formation of spliceosomes. *Cell*, **49**: 763-774.
- Krainer, A.R., and T. Maniatis. 1985. Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing *in vitro*. *Cell*, **42**: 725-736.
- Krainer, A.R., and T. Maniatis. 1988. RNA splicing. In *Frontiers in Molecular Biology: Transcription and Splicing* (ed. B. D. Hames and D. M. Glover), pp.131-206. IRL Press, Oxford/Washington D.C.
- Krainer, A.R., G.C. Conway, and D. Kozak. 1990a. Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes Dev.*, **4**: 1158-1171.

Krainer, A.R., G.C. Conway, and D. Kozak. 1990b. The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites. *Cell*, **62**: 35-42.

Krainer, A.R., T. Maniatis, B. Ruskin, and M.R. Green. 1984. Normal and mutant human β -globin pre-mRNAs are faithfully and efficiently spliced *in vitro*. *Cell*, **36**: 993-1005.

Kramer, A. 1988. Presplicing complex formation requires two proteins and U2 snRNP. *Genes Dev.*, **2**: 1155-1167.

Kramer, A., M. Frick, and W. Keller. 1987. Separation of multiple components of HeLa cell nuclear extracts required for pre-messenger RNA splicing. *J. Biol. Chem.*, **262**: 17630-17640.

Kramer, A., W. Keller, B. Appel, and R. Luhrmann. 1984. The 5' terminus of the RNA moiety of U1 small nuclear ribonucleoprotein particles is required for the splicing of messenger RNA precursors. *Cell*, **38**: 299-307.

Lamond, A.I., M.M. Konarska, and P.A. Sharp. 1987. A mutational analysis of spliceosome assembly: evidence for splice site collaboration during spliceosome formation. *Genes Dev.*, **1**: 532-543.

Lamond, A.I., M.M. Konarska, P.J. Grabowski, and P.A. Sharp. 1988. Spliceosome assembly involves the binding and release of U4 small nuclear ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 411-455.

Lerner, E.A., J.A. Boyle, S.M. Mount, S.L. Wolin, and J.A. Steitz. 1980. Are snRNPs involved in splicing? *Nature*, **283**: 220-224.

Lin, R.-J., A.J. Lustig, and J. Abelson. 1987. Splicing of yeast nuclear pre-mRNA *in vitro* requires a functional 40S spliceosome and several extrinsic factors. *Genes Dev.*, **1**: 7-18.

Lustig, A.J., R.-J. Lin, and J. Abelson. 1986. The yeast RNA gene products are essential for mRNA splicing *in vitro*. *Cell*, **47**: 953-963.

Newman, A., and C. Norman. 1990. 5' splice site recognition in yeast pre-mRNA splicing. *Abstracts of papers presented at the 1990 meeting on RNA processing*, pp108, Cold spring Harbor Lab.

- Newman, A.J., R.-J. Lin, S.-C. Cheng, and J. Abelson. 1985. Molecular consequences of specific intron mutations on yeast mRNA splicing *in vivo* and *in vitro*. *Cell*, **42**: 335-344.
- Ohno, M., H. Sakamoto, and Y. Shimura. 1987. Preferential excision of the 5' proximal intron from mRNA precursors with two introns as mediated by the cap structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 5187-5191.
- Ohno, M., H. Sakamoto, K. Yasuda, T.S. Okada, and Y. Shimura. 1985. Nucleotide sequence of a chicken δ -crystallin gene. *Nucleic Acids Res.*, **13**: 1593-1606.
- Padgett, R.A., S.M. Mount, J.A. Steitz, and P.A. Sharp. 1983. Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonucleoprotein. *Cell*, **35**: 101-107.
- Parker, R., and C. Guthrie. 1985. A point mutation in the conserved hexanucleotide at a yeast 5' splice junction uncouples recognition, cleavage, and ligation. *Cell*, **41**: 107-118.
- Perkins, K.K., H.M. Furneaux, and J. Hurwitz. 1986. RNA splicing products formed with isolated fractions from HeLa cells are associated with fast-sedimenting complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 887-891.
- Pinto, A.L., and J.A. Steitz. 1989. The mammalian analogue of the yeast *PRP8* splicing protein is present in the U4/5/6 small nuclear ribonucleoprotein particle and the spliceosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 8742-8746.
- Reed, R. 1989. The organization of 3' splice-site sequences in mammalian introns. *Genes Dev.*, **3**: 2113-2123.
- Reed, R., J. Griffith, and T. Maniatis. 1988. Purification and visualization of native spliceosomes. *Cell*, **53**: 949-961.
- Ruby, S., and J. Abelson. 1988. An early hierarchic role of U1 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *Science*, **242**: 1028-1035.

- Ruskin, B., P.D. Zamore, and M.R. Green. 1988. A factor, U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing complex assembly. *Cell*, **52**: 207-219.
- Sakamoto, H., M. Ohno, K. Yasuda, K. Mizumoto, and Y. Shimura. 1987. *In vitro* splicing of a chicken δ -crystallin pre-mRNA in a mammalian extract. *J. Biochem.*, **102**: 1289-1301.
- Sawa, H., M. Ohno, H. Sakamoto, and Y. Shimura. 1988. Requirement of ATP in the second step of the splicing reaction. *Nucleic Acids Res.*, **16**: 3157-3164.
- Schwer, B., and C. Guthrie. 1990. PRP16 is a non-snRNP protein required for the second step of splicing *in vitro*. *Abstracts of papers presented at the 1990 meeting on RNA processing*, pp7, Cold spring Harbor Lab.
- Sharp, P.A. 1985. On the origin of RNA splicing and introns. *Cell*, **42**: 397-400.
- Smith, C.W.J., E.B. Porro, J.G. Patton, and B. Nadal-Ginard. 1989. Scanning from an independently specified branch point defines the 3' splice site of mammalian introns. *Nature*, **342**: 243-247.
- Swanson, M.S., and G. Dreyfuss. 1988. RNA binding specificity of hnRNP proteins: a subset bind to the 3' end of introns. *EMBO J.*, **7**: 3519-3529.
- Tani, T., and Y. Ohshima. 1989. The gene for the U6 small nuclear RNA in fission yeast has an intron. *Nature*, **337**: 87-90.
- Tazi, J., C. Alibert, J. Temsamani, I. Reveillaud, G. Cathala, C. Brunel, and P. Jeanteur. 1986. A protein that specifically recognizes the 3' splice site of mammalian pre-mRNA introns is associated with a small nuclear ribonucleoprotein. *Cell*, **47**: 755-766.
- Vankan, P., C. McGuigan, and I.W. Mattaj. 1990. Domains of U4 and U6 snRNAs required for snRNP assembly and splicing complementation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.*, **9**: 3397-3404.
- Vijayraghavan, U., and J. Abelson. 1990. PRP18, a protein required for the second reaction in pre-mRNA splicing. *Mol. Cell. Biol.*, **10**: 324-332.

Vijayraghavan, U., M. Company, and J. Abelson. 1989. Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **3**: 1206-1216.

Winkelman, G., M. Bach, and R. Luhrmann. 1989. Evidence from complementation assays *in vitro* that U5 snRNP is required for both steps of mRNA splicing. *EMBO J.*, **8**: 3105-3112.

Zamore, P.D., and M.R. Green. 1990. Characterization of the mammalian splicing factor U2AF. *Abstracts of papers presented at the 1990 meeting on RNA processing*, pp2, Cold spring Harbor Lab.

Zhuang, Y., and A.M. Weiner. 1986. A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell*, **46**: 827-835.

Zhuang, Y., and A.M. Weiner. 1989. A compensatory base change in human U2 snRNA can suppress a branch site mutation. *Genes Dev.*, **3**: 1545-1552.

Zillmann, M., M.L. Zapp, and S.M. Berget. 1988. Gel electrophoretic isolation of splicing complexes containing U1 small nuclear ribonucleoprotein particles. *Mol. Cell. Biol.*, **8**: 814-821.